

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-505073

(P2003-505073A)

(43) 公表日 平成15年2月12日 (2003.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 13/00		C 1 2 N 13/00	4 B 0 2 4
A 6 1 N 1/30		A 6 1 N 1/30	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/42		C 1 2 M 1/42	4 B 0 3 3
// C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 6 5
15/09		5/00	E 4 C 0 5 3
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁)	

(21) 出願番号 特願2001-512854(P2001-512854)
 (86) (22) 出願日 平成12年7月20日 (2000.7.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年1月21日 (2002.1.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US 00/19975
 (87) 国際公開番号 WO 01/007584
 (87) 国際公開日 平成13年2月1日 (2001.2.1)
 (31) 優先権主張番号 09/358,510
 (32) 優先日 平成11年7月21日 (1999.7.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/618,949
 (32) 優先日 平成12年7月19日 (2000.7.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ザ・レジエンツ・オブ・ザ・ユニバーシティー・オブ・カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オークランド フランクリン ストリート 12
 ス フロア 1111
 (72) 発明者 ラビンスキー ボリス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オルバニー ソノマ ストリート 1619
 (72) 発明者 ファン ヤン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パークレイ ジョセフィン ストリート 1441
 (74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制御されたエレクトロポレーションおよび細胞を介した膜物質輸送

(57) 【要約】

個々の生物細胞、複数の生物細胞、または生物組織に対して、本明細書でエレクトロポレーションする細胞中の電流と電圧の比と定義される電気インピーダンスをモニターすることにより制御された様式でエレクトロポレーションを実施する。インピーダンスにより生物細胞のエレクトロポレーション開始が検出され、この情報を用いて、細胞を破壊することなくエレクトロポレーションが生じるように電圧の大きさと時間を制御する。これはエレクトロポレーション一般に適用することができる。さらに、エレクトロポレーションおよび/または細胞膜を介した大量輸送において、2つの槽の間の仕切りに空いた開口部が細胞でふさがれるように該開口部に細胞を固定する、特定の方法および器具を開示する。目的が、孔形成、膜を介した溶質の拡散輸送、またはその両方のいずれかによって、仕切りを電氣的に絶縁するか、溶質に対して不浸透性にするか、またはその両方にするかが決定される。エレクトロポレーションは2つの槽の間に電圧をかけることによって実施される。拡散輸送は、細胞周囲の液体と細胞内部の液体との溶質濃度の差、または

2つの槽自体の濃度差によって実施される。電流および拡散輸送は開口部を通る流路に制限される。

(2)

特表2003-505073

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の段階を含む方法：

第一の点と、生物細胞を含む導電性媒質により該第一の点から隔離されている第二の点との間に電荷の差を生じさせる段階；

第一の点と第二の点との間で第一の電気的パラメータを測定する段階；および第一の電気的パラメータの測定結果に基づいて第二の電気的パラメータを調整する段階。

【請求項 2】 第一の電気的パラメータが、電流、電圧、および電気インピーダンスからなる群より選択され、且つ第二の電気的パラメータが、電流、電圧、および電流と電圧の組合せからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 以下の段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法：

導電性媒質中に物質を入れる段階、および該物質を生物細胞中に移動させるために第二の電気的パラメータを調整する段階。

【請求項 4】 第一の点が第一の電極であり、第二の点が第二の電極であり、且つ物質が薬学的に活性を有する化合物およびヌクレオチド配列からなる群より選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 媒質中の物質が生物細胞中に移動する様な様式で、且つ該生物細胞の生存力が持続されるような様式で、測定および調整が実質的に連続して、且つ実質的に同時に実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】 媒質が複数の生物細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 生物細胞が生きている生物中に存在する組織を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 生きている生物が動物である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 動物が無脊椎動物および脊椎動物からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 脊椎動物が哺乳類である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 哺乳類がヒトである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 以下の段階を含む方法：

(3)

特表2003-505073

第一の点と、生物細胞を含む導電性媒質により該第一の点から隔離されている第二の点との間に電流を流す段階；

該媒質中で第一の電氣的パラメータを測定する段階；および

該第一の電氣的パラメータの測定から得られた情報を用いて第二の電氣的パラメータを調整する段階。

【請求項 1 3】 第一の電氣的パラメータが、電流、電圧、および電気インピーダンスからなる群より選択され、且つ第二の電氣的パラメータが、電流、電圧、および電流と電圧の組合せからなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 細胞膜を破壊することなく該細胞のエレクトロポレーションが実施されるような様式で、測定および調整が行われる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】 以下の段階をさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法：
媒質に治療的効果をもつ化合物を添加する段階；および、
該化合物を細胞中に移動させる段階。

【請求項 1 6】 生物細胞を通過する電流以外は第一の点と第二の点との間の電流を実質的に遮断する段階
をさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】 以下の段階をさらに含む、請求項 1 6 に記載の方法：
導電性媒質中に物質を入れる段階、および該物質を生物細胞中に移動させるために電流を調整する段階。

【請求項 1 8】 以下の段階を含む、制御された様式で生物細胞にエレクトロポレーションを実施する方法：

(a) 導電性媒質中に生物細胞を入れる段階、および該媒質に電圧を印加する段階；

(b) 該媒質に印加された電圧に対する、該媒質を通る電流の比を連続的に検出する段階；および

(c) 該生物細胞のエレクトロポレーションを制御された程度で実施するために、検出した電圧対電流比に生じた変化に従って該印加電圧の強さを調整する段

(4)

特表2003-505073

階。

【請求項19】 段階（b）が、生物細胞のエレクトロポレーションの指標として電圧対電流比を連続的に検出する段階を含み、段階（c）が、特定の望ましい程度のエレクトロポレーションを実施するために該電圧対電流比に従って印加電圧の持続時間を調整する段階を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 複数の生物細胞を導電性媒質に入れ、電圧対電流比を複数の生物細胞について平均化し、それによって該複数の生物細胞に対して制御された平均的程度のエレクトロポレーションを実施する、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 電圧が2つの微小電極間に印加され、生物細胞が該微小電極間に置かれる、請求項18に記載の方法。

【請求項22】 電圧がフロースルーチャンネル内の2つの電極間に印加され、該電極が該チャンネルを通過する流れを横切る方向に電圧が印加されるように配置され、

段階（a）が、生物細胞を媒質中に懸濁する段階と、該媒質を該チャンネルに連続的に通過させる段階とを含み、

段階（b）が、該電極間に該生物細胞が存在する段階と、該電圧対電流比とを相関させる段階とをさらに含み、

段階（c）が、該電極間に該生物細胞が存在する際に該電圧の強さを調整する段階を含む、

請求項18に記載の方法。

【請求項23】 複数の生物細胞を導電性媒質に懸濁する段階、および1度に約1つの細胞が電極を通過するように媒質をチャンネルに連続的に通過させる段階を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 以下の段階を含む、制御された様式で生物組織にエレクトロポレーションを実施する方法：

（a）生物組織を導電性媒質中に入れる段階、および媒質に電圧を印加する段階；

（b）該生物組織におけるエレクトロポレーションの程度の指標として、該媒質に印加された電圧に対する、該媒質を通る電流の比を連続的に検出する段階；

(5)

特表2003-505073

および

(c) 該生物組織において制御された程度のエレクトロポレーションを実施するために、該電圧対電流比の大きさの変化に従って該印加電圧の強さを調整する段階。

【請求項 2 5】 エレクトロポレーションの開始の検出および制御が可能な様式でエレクトロポレーションにより化学物質を生物細胞に注入する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 該化学物質を溶解した液体を含む電気セルであって、電圧が該電気セルに印加された場合に、実質的に全電流を迂回させずに該生物細胞に該生物細胞を通る流路に電流を限定するように配置された仕切りを含む電気セルの中に、該生物細胞を固定する段階；

(b) 該電気セルに電圧を印加する段階、ならびに該細胞にエレクトロポレーションが起きたことの指標として該細胞を通る電流および該印加電圧の相対的な値をモニターする段階。

【請求項 2 6】 仕切りが電気セル内の第一および第二の電極槽を分け、生物細胞の幅より小さな開口部を含み、かつ (a) が、該生物細胞によって該開口部を閉じるように該生物細胞を該開口部上に固定する段階を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】 第一の電極槽が第一の導電性の液体を含み、第二の電極槽が第二の導電性の液体を含み、化学物質が該第一および該第二の導電性の液体のうちの一方にのみ溶解される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】 第一の電極槽が第一の導電性の液体を含み、第二の電極槽が第二の導電性の液体を含み、化学物質が該第一および該第二の導電性の液体の両方に溶解される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】 (a) が、開口部を挟んで圧差をかけて該開口部の片面に生物細胞を押し付けることにより実施される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 0】 (a) が、開口部周囲の領域に、仕切りに結合する物質を含む被覆を施すことにより実施される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 1】 第一の電極槽が液体の連続流を許容するように構築および

(6)

特表2003-505073

配置される請求項 2 6 に記載の方法であって、該第一の電極槽を通る第一の導電性の液体の連続流を発生させる段階をさらに含む方法。

【請求項 3 2】 第一および第二の電極槽がそれぞれの槽を独立に通る液体の連続流を許容するように構築および配置された請求項 2 6 に記載の方法であって、該第一の電極槽を通る第一の導電性の液体の連続流および該第二の電極槽を通る第二の導電性液体の連続流を発生させる段階をさらに含む方法。

【請求項 3 3】 電気セル内に複数の生物細胞を固定する段階を含み、仕切りが実質的に全電流を迂回させずに複数の生物細胞に複数の全ての生物細胞を通る流路に電流を限定する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 4】 電気セル内に 1 つのみの生物細胞を固定する段階を含み、仕切りが実質的に全電流を迂回させずに 1 つのみの生物細胞に該 1 つのみの生物細胞を通る流路に電流を限定する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 5】 電気セルが透明である請求項 2 5 に記載の方法であって、電圧の印加中に生物細胞の変化を観察する段階をさらに含む方法。

【請求項 3 6】 生物細胞膜を介した選択された速度の物質輸送を実施するために、または該膜の物質輸送特性の決定を容易にするために、制御された様式で該膜を介して化学種を通過させる方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 第一および第二の槽の間の仕切りに存在する開口部であって、該細胞によってふさがれるように該細胞より幅の小さな開口部上に、該細胞を固定する段階；および

(b) 第一の液体を該第一の槽に、第二の液体を該第二の槽に入れる段階であって、溶質が該細胞中へと拡散するように第一および第二の液体のうち少なくとも一方は該細胞中の濃度より十分に高い濃度で該溶質を含む段階。

【請求項 3 7】 開口部を挟んで圧差をかけて該開口部の片面に細胞を押し付けることによって、該開口部上へ該細胞の固定が実施される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】 膜に結合する物質を含む被覆を開口部周囲の領域に施すことによって、該開口部上へ該細胞の固定が実施される、請求項 3 6 に記載の方法。

(7)

特表2003-505073

【請求項 3 9】 第一および第二の槽がそれぞれの槽を独立に通る液体の連続流を許容するように構築および配置され、且つ該第一の槽を通る第一の液体の連続流および該第二の槽を通る第二の液体の連続流によって (b) が実施される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】 溶質が拡散輸送によって第一の液体から第二の液体へと移動するように該第一の液体中の溶質の濃度が該第二の液体中の濃度より十分に高く、仕切りが該溶質に対して十分に不透過性であり、かつ拡散輸送が細胞を通る拡散経路に限定されるように該細胞が該開口部に十分に固定される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 1】 膜を介した物質輸送係数が既知であるような溶質が選択され、かつ該溶質を細胞に注入する方法であって、あらかじめ選択された量の該溶質を該細胞に注入するために第一の液体中の該溶質濃度および拡散輸送の継続時間を既知の物質輸送係数に基づいて選択する段階をさらに含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】 溶質が細胞内へと拡散している際に細胞の変化をモニターする段階をさらに含み、変化が膜を介した該溶質の物質輸送速度を決定する手段として該溶質の該細胞への注入の程度を表す、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】 仕切りおよび槽が透明な外被に囲まれており、溶質が生物細胞内へと拡散する際に生物細胞の変化を観察する段階をさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 4】 エレクトロポレーションにより化学物質を生物細胞に注入するための器具であって、

生物細胞を保持するための内部支持体および電流に対して実質的に不透過性の物質を有する内部仕切りを含む電気セルであって、仕切りが電気セル内の電流を内部支持体を横断しかつ該内部支持体に保持されるあらゆる生物細胞を通過する経路に限定する電気セル、ならびに

該電気セルに電圧を印加する手段、ならびにそこに保持されるあらゆる生物細胞におけるエレクトロポレーションの発生および程度の指標として電流および電圧の相対値をモニターする手段

(8)

特表2003-505073

を含む器具。

【請求項4 5】 仕切りが電気セルの内部を第一および第二の電極槽に分け、内部支持体が該仕切りにおける幅が生物細胞より小さな開口部である、請求項4 4に記載の器具。

【請求項4 6】 開口部に生物細胞をつかえさせるために該開口部を挟んで圧差をかける手段をさらに含む、請求項4 4に記載の器具。

【請求項4 7】 第一の電極槽がフロースルーチャネルである、請求項4 4に記載の器具。

物質を該生物細胞中へと移動させるための電流

(9)

特表2003-505073

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は全体としてエレクトロポレーションおよび細胞膜を介した物質輸送に関し、特に細胞膜を介したイオンの輸送に関する。

【0002】

発明の背景

エレクトロポレーションは生物細胞に化学種を導入するのに用いられる技術で、細胞膜を横断する電位に細胞を曝露することによって実施される。エレクトロポレーションはその機序が完全に理解されているわけではないが、細胞膜の脂質二重層が破壊されて一過的または永久的な孔が形成され、この孔を通じて化学種が拡散によって細胞内に入るようになると考えられている。電位は典型的にはパルスで加えられ、孔形成が可逆的なものか不可逆的なものかは、パルスの振幅、長さ、形状、繰返し数などのパラメータ、ならびに細胞の種類と发育段階によって決定される。細胞に化学種を導入する方法として、エレクトロポレーションは数多くの利点を有している。使用が簡便であること；細胞集団をすべて同時に処理できること；本質的にいかなる高分子でも細胞に導入できること；初代培養細胞および樹立細胞株に幅広く用いることができ、且つ特定の細胞株で特に有効であること；細胞の種類および由来による大きな修正や適合の必要なしに原核細胞にも真核細胞にも使用できることなどである。現在、エレクトロポレーションは懸濁中または培養中の細胞、ならびに組織および器官中の細胞にも用いられている。

【0003】

現在行われているエレクトロポレーションでは、高電圧電場のパルスが発生するジェネレータに接続した2つの電極の間に、懸濁中または組織中の1つまたは複数の細胞が置かれる。膜の孔形成または透過化は、細胞膜上の電極と直接接する部位、すなわち膜内外電位差が最も高くなる部位である、細胞の極で起こる。残念ながら、エレクトロポレーションで生じる透過化の程度は細胞の種類によって異なり、所定の母集団の細胞でも細胞ごとに異なる。さらに、エレクトロポレー

(10)

特表2003-505073

ションはそれぞれ異なる特性をもつ個々の細胞の大きな母集団に対して行われるため、エレクトロポレーションの条件はその細胞母集団の平均的な質に合わせて決定するしかなく、すなわち現在用いられている方法では、個々の細胞の特定の特性に適合させることができない。特に問題となるのは、特定の条件下では電位が低すぎて細胞膜を透過化できず、別の条件下ではエレクトロポレーションにより孔が不可逆的に形成され細胞が死に至るということである。例えば高い電場では、細胞母集団中の一部の細胞でトランスフェクション効率が高くなる一方、死ぬ細胞も多くなる。既知の各種エレクトロポレーション法のさらなる問題点として、エレクトロポレーションによるトランスフェクション効率が時として低くなるということがある。例えばDNAの場合、細胞の形質転換を効果的に行うには、周囲の媒質にDNAが大量に含まれている必要がある。

【0004】

上述の問題の多くは、個々の細胞および組織におけるエレクトロポレーション工程をリアルタイムで制御できないことに起因している。現在のところ、細胞がいつエレクトロポレーション状態に入るのかをリアルタイムで確認する手段はない。したがって、エレクトロポレーションプロトコルの成果は、物質輸送工程とそれが細胞に及ぼす影響の最終的な結果から判断するよりほかない。これらは、エレクトロポレーション時の物質輸送が起こってから長時間を経た後に生ずる。本発明では、既存のエレクトロポレーション法におけるこれらの欠点およびその他の欠点を解決する。

【0005】

また、本発明に関することとして、細胞膜を介した物質輸送の研究と制御の既存の手法がある。正常に機能している細胞についても異常な細胞についても、自然状態での細胞膜を介した物質輸送に関する知識は、特定の疾患の研究に貴重である。さらに、細胞膜を介した物質輸送を修正および制御することができれば、現代のバイオテクノロジーおよび医学における研究と治療を行う上で有用なツールとなる。DNAや蛋白質などの化学種を細胞に導入して、または細胞から除去して、細胞の機能、生理、または挙動を制御することにより、正常および異常な細胞の生理学的工程に関する情報が得られる。

(11)

特表2003-505073

【0006】

エレクトロポレーションを用いるか否かに関わらず、細胞膜を介した物質輸送の実施と研究に最も広く用いられている方法は、細胞膜を介して輸送したい化合物を含む溶液に細胞を接触させることである。バルク輸送法では、細胞膜を介した物質輸送を正確に制御または測定することができない。特定の位置における溶液の成分構成は未知であり、且つ一定でない。加えて、電場が存在する場合は、局所的な電界強度が場所によって異なる。さらに、溶液に曝される細胞表面が正確に定義されていない。所定の集団内の細胞の表面積はそれぞれ異なり、このため物質輸送の量は細胞ごとに大きく異なる。この理由から、バルク輸送工程による物質輸送の量は細胞間で均一でなく、特定の細胞に実際に輸送された量を決定することもできない。

【0007】

バルク輸送法の限界を克服するために行われてきた試みとして、細胞を個々に処理する技術があり、これには、細胞膜を通じた化合物の機械的注入（マイクロインジェクション）または微小電極を用いたエレクトロポレーションが含まれる。注入技術では、細胞膜に針を刺して化学物質を送達させ、化学物質を注入部位近傍の小領域に局在させる。これには人の手による細胞の操作が必要であるが、操作が困難な技術であり、労働力集約的で、且つ再現性の確保も容易ではない。微小電極を用いたエレクトロポレーションにもこれらの問題があり、また、個々の細胞におけるエレクトロポレーション開始を検出する手段がない。本発明ではこれらの問題点も同様に解決する。

【0008】

発明の概要

細胞膜を介した物質移動の正確なモニタリングを可能にするための装置、システム、および特定の方法を開示する。細胞膜を介した物質移動のモニタリングから得られた情報を直接利用して、細胞および／または細胞膜に関する情報を推論することができる。あるいは、モニタリングから得られた情報を利用して、電流の印加を制御するなどにより細胞膜を介した物質移動を制御することができる。本発明の装置およびシステムにより、荷電分子、特にイオン種を、細胞膜を介し

(12)

特表2003-505073

て移動させることが可能になり、またこの移動の発生を正確にモニタリングすることも可能になる。本発明の装置、システム、および方法を用いてエレクトロポレーションを実施する際、細胞膜を介した荷電粒子の移動をモニターして得られた情報は、細胞膜を介した物質輸送工程を制御するために用いられる。具体的には、本発明のシステムは、電流印加により細胞の物質輸送特性が変化する際の、細胞膜内外間の電気インピーダンスの値と変化を測定するために使用される。こうして、電流印加により生じた電気インピーダンスの変化に関する情報をリアルタイムで利用して、細胞膜を介した荷電分子の移動を制御する。

【 0 0 0 9 】

本発明の一つの局面は、第一の点と、生物細胞を含む導電性媒質により第一の点と隔離されている第二の点との間に電荷の差を生じさせることを含む方法である。次に、第一の点と第二の点との間で第一の電気的パラメータを測定する。次に、第一の電気的パラメータの測定に基づいて第二の電気的パラメータが調整される。第一の電気的パラメータは、電流、電圧、および電気インピーダンスからなる群より選択されるものなど、いかなるパラメータであってもよい。第二の電気的パラメータは、電流、電圧、または電流と電圧の組合せからなる群より選択されるものなどの、いかなるパラメータであってもよい（第一の電気的パラメータと同じものであっても、または違うものであってもよい）。

【 0 0 1 0 】

この方法の好ましい態様では、導電性媒質中にさらに物質を入れ、また、この物質を生物細胞中に移動させる目的で第二の電気パラメータを調整する。導電性媒質中に入れる物質は、薬学的活性を持つ化合物もしくは薬剤、ヌクレオチド配列、蛍光色素、または望ましい方法で細胞に影響するように特別に設計された結晶などの、いかなる物質であってもよい。本方法に従って、2点間の電位が細胞を穿孔するのに十分なだけ高くなるように、種々の条件を調整する。しかし、特に要求のある場合以外は、2点間の条件をさらに調整して、細胞死が起こらないように可逆的なエレクトロポレーションを行う。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の局面は、細胞中へまたは細胞外への物質移動ではなく、細胞また

(13)

特表2003-505073

は細胞群を分析してその組織またはその組織をもつ個体の情報または診断を得ることを目的としてエレクトロポレーションを実施することである。本方法に従って、第一の点と、生物細胞を含む導電性媒質により第一の点と隔離されている第二の点との間に電荷の差を生じさせる。次に、第一の点と第二の点との間で第一の電氣的パラメータを測定する。次に、第一の電氣的パラメータの測定値を分析して、細胞の性質、特に細胞膜の性質を決定する。第一の電氣的パラメータはいかなるパラメータであってもよく、好ましくは電流、電圧、および電気インピーダンスからなる群より選択される。第二の電氣的パラメータは、好ましくは溶媒中に存在する1つまたは複数の細胞の細胞膜に影響するような様式で調整される。第二の電氣的パラメータはいかなるパラメータであってもよく、好ましくは電流、電圧、または電流と電圧の組合せからなる群より選択される。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の局面は、好ましくは第一の電極、第二の電極、および電源を含む装置である。電源は、後にこれら電極に接続することができるものであるが、装置販売時にはついていなくてもよい。この装置はさらに、定められた経路の電流以外の、第一の電極と第二の電極との間の電流を妨げる手段を含む。さらにこの装置は、定められた経路における電流、電圧、電気インピーダンスなどの電氣的パラメータを測定する手段を含み、且つ測定した電氣的パラメータに基づいて電源を調整する手段を含む。電流を妨げる手段は、好ましくは非導電性物質を含み、定められた経路はそれぞれ直径が生物細胞の直径より小さい1つまたは複数の開口部を含み、これにより細胞は定められた経路の中に捉えられ、電流は細胞中を通るが、好ましくは細胞周囲を通らない。

【 0 0 1 3 】

本発明の装置およびシステムは、所望の結果を得るために生物細胞内または生物細胞外へ広範な物質を移動させることを目的として、本方法で用いることができる。その方法は、個々の細胞、細胞群、培養細胞、または、例えば無脊椎動物、哺乳類を含む脊椎動物、植物などの生きている生物の細胞に対して行うことができる。複数の細胞（例えば組織）に対してこの方法を行う場合は、組織の画像取得と画像に基づくリアルタイムの電流調整との工程を用いることができる。適

(14)

特表2003-505073

用できる画像取得技術の1つは、電気インピーダンストモグラフィ (EIT) である。この技術は、体内または生物 (例えばヒト) の生体電気的特性の差に基づいて画像を生成する。本発明の方法において、単一の生物細胞に対して本工程を行うときに測定段階が用いられるのと同様の様式で、EIT画像を用いることができる。本質的に、EIT技術により、エレクトロポレーションに起因する電流増加作用を「見る」ことが可能となり、これから得られる情報を用いて、永久的な破壊を生じさせることなく細胞膜を透過化できるように電流を正確に調整することができる。

【0014】

本発明のまた別の局面として、第一の点と、組織を含む導電性媒質により第一の点と隔離されている第二の点との間に電流を流すことを含む方法がある。組織は、脊椎動物または無脊椎動物などの生きている生物、特に哺乳類およびヒトを含む生きている生物に存在していてもよい。電流を流した後、組織の電気インピーダンスなど電気的パラメータに基づいて組織の画像を生成する。この画像を指針として、組織中の生物細胞に望ましい程度のエレクトロポレーションが行われるように電気的パラメータを調整する。エレクトロポレーションにより電気インピーダンスが変化し、この変化は生成される画像上に視覚化することができる。調整される電気パラメータは、電流、電圧、または電流と電圧の組合せなど、いかなるパラメータであってもよい。好ましい態様では、組織中に注入するなどして物質を導電性媒質中に入れ、物質を組織の生物細胞中に移動させるように画像に基づいて電流の調整を行う。生成される画像は、好ましくは、既知の入力電流および測定した入力電圧を元に、再構成アルゴリズムを用いて生成されるインピーダンス画像である。インピーダンス画像は、既知の入力電圧、測定した入力電流、または既知の入力電圧と測定した入力電流の組合せを元に生成することもできる。

【0015】

この方法を実施するための装置は本発明のまた別の局面であり、この装置は、導電性媒質に電流を流す手段を含む。この装置はさらに、画像を生成するために導電性媒質の第一の電気的パラメータを分析する手段と、導電性媒質中の生物細

(15)

特表2003-505073

胞に望ましい程度のエレクトロポレーションを行うために生成した画像に基づいて第二の電気的パラメータを調整する手段とを含む。第一の電気的パラメータは好ましくは電気インピーダンスであり、第二の電気的パラメータは好ましくは電流、電圧、または両者の組合せからなる群より選択される。電流は、好ましくは、組織上のエレクトロポレーションを行おうとする位置の近傍に置かれた複数の電極により生成される。

【0016】

本発明の由来の一つは、生物細胞におけるエレクトロポレーションの開始および範囲が、生物細胞または生物細胞を含む導電性媒質の電位インピーダンス（本明細書においてこの用語は電圧に対する電流の比を意味する）の変化に相関するという発見である。生物細胞における電圧対電流比の増大は、孔形成もしくは細胞の損傷、またはその他の様式の細胞膜穿孔によって細胞膜が透過化されたときに生じる。同様に、流れている導電性の液体における電圧対電流比の低下は、液体がフロースルー電気セル中の電極間の領域に生物細胞を引き込んだときに生じる。したがって、生物細胞のまたは細胞を懸濁した電解液のインピーダンスをモニターすることによって、細胞膜に孔形成が起こった時点、および孔形成による細胞膜における透過性の相対的程度を検出することができる。この情報を用いて、所定の細胞に実際にエレクトロポレーションが生じたことを確認することができ、または、例えば電圧の強さなどの選択された電気パラメータを制御することによってエレクトロポレーション工程を制御することができる。またこの発見は、細胞培養、または脊椎動物、無脊椎動物、もしくは植物中に含まれる多数の細胞を同時にエレクトロポレーションする上でも有用である。特定の態様ではヒトを含む哺乳類に本発明を適用する。この方法により、エレクトロポレーションが実際に発生したことを示す直接的な指標、および、処理対象の全細胞を平均したエレクトロポレーションの程度の指標が得られる。またこの発見は、同じ理由から、生物組織（連続する膜を持つ生物細胞の塊）のエレクトロポレーションにも同様に有用である。

【0017】

この方法の恩典として、エレクトロポレーションの開始と程度を高度に制御で

(16)

特表2003-505073

きること、ならびに、特定の個々の細胞または細胞塊における透過化の発生と程度がより詳細にわかることがある。個々の細胞または一連の個々の細胞に対してこの方法を適用すれば、個々の細胞が確実に透過化され、化学種の導入によって形質転換される。また、電気的環境のばらつきがあると一部の細胞が破壊されて、一部の細胞で十分な結果が得られないことがあるが、この方法では、ばらつきがなくなるためエレクトロポレーションの有効性を増加させることができる。

【0018】

本発明は、生物細胞を中に置くための電気装置またはシステムであって、生物細胞を迂回する電流が実質的に全く存在しないようにしながら生物細胞を通過する電流路に電流を導き、それによってイオンの流れを導くための仕切りを有する電気装置またはシステムを使用する、単純な態様を説明することによって理解されると思われる。本発明では、これら態様のいくつかにおいて、実質的に電流を通さない仕切りによって隔離された2つの貯液槽を有する器具が使用される。仕切りには、生物細胞より小さい開口部があり、生物細胞が開口部に引っかかるとその生物細胞によって開口部が塞がれるか、または閉じられるようになっている。エレクトロポレーションを実施するため、生物細胞は機械的、化学的、および／または生化学的な方法で、好ましくは後に生物細胞を損傷のない様式で取り除くことができるように可逆的な状態で、開口部に固定される。生物細胞が開口部に固定されると、開口部に固定された生物細胞をはさんで2槽の間に電圧が印加される。2槽間を流れる電流は開口部通る経路、したがって生物細胞を通る経路に限定される。電気セル内の電流と電圧の関係をモニターすることによりエレクトロポレーション開始の検出と孔形成の程度の制御が行われ、これによりエレクトロポレーションが確実に行われかつ過剰な孔形成と細胞死が回避される。したがって使用者は、生物細胞膜の状態と変化に関して非常に正確な情報と制御を得ることができる。

【0019】

別の一連の態様において、本発明は生物細胞内または生物細胞外への化学種の拡散輸送に有用である。これらの態様でも電気セルは仕切りによって2つの槽に分けられ、一方の槽から他方の槽への細胞周囲の液体の移動が実質的に妨げられ

(17)

特表2003-505073

るような様式で、生物細胞が仕切りに設けられた開口部に引っかかる。生物細胞に導入しようとする化学種の溶液を2槽のうちの一方または両方に入れる。溶液中の化学種の濃度が細胞中の濃度と異なるようにする（化学種を細胞に導入しようとするか、または細胞から除去しようとするかによって、高くするか低くするかが決定される）。あるいは、溶液中の化学種の濃度が2つの槽で濃度が異なるようにする。

【0020】

拡散輸送に本発明を適用した好ましい態様では、拡散輸送の力が槽と生物細胞にかかるのではなく、むしろ2つの槽の間にかかるように、それぞれの槽に濃度の異なる溶液を入れる。拡散の進行に伴って経時的または連続的に二槽の各濃度の把握と制御されたモニタリングを行い、また、開口部の寸法を正確に把握することによって、使用者は化学種が細胞に入っていく速度と量を正確に観察および制御することができる。拡散時間は、一方の槽または両方の槽の濃度を段階的に変化させることによって濃度差を生じさせるか、またはなくすことで制御することができる。特に興味深い応用は、以下の段落に記載するように、この種の化学種拡散輸送を制御されたエレクトロポレーションと組合せることである。

【0021】

本発明は、エレクトロポレーション技術との関連で有益であるばかりでなく、電気インピーダンスをモニターすることによって細胞膜の完全性に関する情報を提供することで、細胞、細胞群、または細胞群を含む組織に関する有益な情報を提供することができる。具体的には、細胞膜を介した荷電粒子の動きに関する測定が行われる。これらの測定値は、細胞膜を介した拡散を生じさせるのに必要な電流の量に関連する。得られた情報は、直接分析するか、同一組織の以前の測定値と比較するか、または異常組織もしくは正常組織の測定値と比較することができ、これにより、測定対象の組織に生じた変化の量（同一組織の以前の測定値に基づいて）、または測定対象の組織と細胞膜が損傷された組織（例えば異常細胞）もしくは正常な細胞や組織との差の量の指標が得られる。この方法は、エレクトロポレーションで用いられるのと同様の方法で行われる。ただし、細胞周囲の媒質に物質を添加する必要がない。装置は、仕切りで2つの部分に区切られ、一

(18)

特表2003-505073

方に陽電極、他方に陰電極があること、仕切りには開口部があり、開口部と細胞を通して一方の電極から他方の電極へ荷電粒子が流れるような様式で開口部上に細胞が位置することにおいて前述の装置と同様である。仕切りによって、開口部を通る以外の荷電粒子の流れは妨げられるかまたは完全に失われる。電極間の電気インピーダンスを測定することにより、無傷の膜をもつ細胞と膜が損傷された細胞とを区別することができる。測定をより正確に行うことにより、損傷された（例えば異常な）細胞膜と比較した正常な細胞膜の完全性について判断することができる。

【0022】

本発明の様々な態様はそれぞれ、その工程中に、2つもしくはそれ以上（すなわち複数の）生物細胞に同時に、または動物または植物のものでありうる組織などの細胞の塊に用いることができる。前述の器具は、電流または拡散輸送が細胞を迂回しないようにしながら電流または拡散輸送がすべての細胞を通る経路に限定されるように仕切りを配置することによって、2つまたはそれ以上の生物細胞への用途に適合させることができる。本発明の概念のさらなる用途として、流れている液体中に懸濁された生物細胞のエレクトロポレーションがある。電極をフローチャネル中に固定し、電極間の電流をモニターしながら電極間に電圧を印加する。電極間の領域に入った生物細胞は電流値を低下させて、すなわち、インピーダンスは、この領域に細胞が1つまたは複数存在することの指標となり、さらには、エレクトロポレーションを実施するのに十分なより高い電圧の印加を開始するためのシグナルとしても利用できると考えられる。

【0023】

本発明の装置、システム、および方法のさらなる用途として、哺乳類などの生きている生物に存在しうる組織中に存在する生物細胞のエレクトロポレーションがある。組織中に電極を固定して配置し、電極間の電流をモニターしながら電極間に電圧を印加する。電極間の領域内に無傷の膜をもつ生物細胞がある場合は電気インピーダンスが増加する。したがって、電気インピーダンスを測定することによって、その領域内に1つまたは複数の細胞が存在するかどうかの指標が得られる。エレクトロポレーションによりインピーダンスの測定値が低下すると考え

(19)

特表2003-505073

られる。この方法を組織に対して実施する場合、電気インピーダンスの測定値は電極間に存在する細胞の統計的平均値となる。

【 0 0 2 4 】

細胞膜に形質転換が生じ、膜を通して電流が流れるようになった時期（および、好ましくはある程度は程度）を決定可能な画像技術を用いて、本発明のエレクトロポレーション法を生きている生物の組織に実施することができる。好ましい画像技術は、画像化の対象とする組織の生体電気的特性の差に関する情報を元に、変化する画像を生成する電気インピーダンストモグラフィ（EIT）である。典型的なEIT画像は、体内に電流を流し、その結果生じる電圧を電極アレイで測定することによって取得される。次に、再構成アルゴリズムを用いて、既知の入力電流および測定した電圧のデータからインピーダンス画像が生成される。EITでは電気インピーダンスが実際にマッピングされるため、本発明を組織に適用するのに特に適している。エレクトロポレーションを行おうとする部位はすなわち細胞の電気インピーダンスがその分変化する部位であり、したがって、EITにより画像化される。この画像を用いて、細胞膜を損傷することなくエレクトロポレーションが生じるような様式で電気パラメータ（例えば電流値）を調整する。

【 0 0 2 5 】

先行技術と比較して本発明が有する利点として、細胞を個々に処理できること、および個々の細胞の必要に合わせて処理条件を適合できることがある。電圧が印加される態様において、使用者はインピーダンスをモニターすることにより、孔の有無、孔形成の進行度、および、細胞死につながる可能性のある不可逆的な孔形成が生じたかどうかを知ることができる。

【 0 0 2 6 】

仕切りと開口部を有する器具の利点の1つは、開口部を通る経路に電流を限定することによるシグナル対雑音(S/N)比の高さである。

【 0 0 2 7 】

さらなる利点の一つは、この器具および方法を統合して、各細胞の状態を機器によってモニターし、モニターした状態に応じたタイミングで個々の細胞を開口部に捉え、その後取り除くような自動装置を構成できることである。

(20)

特表2003-505073

【 0 0 2 8 】

本発明の一つの局面として、検出された電流の変化をリアルタイムに測定し、これに基づいてシステムに与える電氣的パラメータ（例えば電圧および／または電流）を調整することによって、生物細胞のエレクトロポレーションを制御する方法がある。

【 0 0 2 9 】

本発明の特徴の一つは、本発明の全体的な概念を適用して、1つの細胞、複数の細胞、組織、または生きている動物中の組織の一部にエレクトロポレーションを行えることである。

【 0 0 3 0 】

本発明の利点の一つは、得られたエレクトロポレーションの量と関連する電流の変化をリアルタイムに測定し、これに基づいて任意の電氣的パラメータ（例えば電圧および／または電流）を調整することによって、正確な量のエレクトロポレーションが実施され、かつ細胞の損傷が回避できることである。

【 0 0 3 1 】

本発明の別の利点は、ヌクレオチド配列を送達のためにウイルスベクターに入れる必要がなく、したがってベクターの細胞特異性が必要とされないヌクレオチド配列による細胞のトランスフェクションに本発明を利用できることである。

【 0 0 3 2 】

さらに他の利点には、本方法が比較的低い技術熟練度でも比較的迅速に行えることがある。

【 0 0 3 3 】

さらに別の利点には、本方法を用いることによって、免疫反応を起こすことなく細胞のトランスフェクションが行えることがある。

【 0 0 3 4 】

さらに別の利点は、本方法がDNAのサイズ（すなわちDNA配列の長さ）に制限されないこと、および細胞中に運び込まれるDNA量が制御できることである。

【 0 0 3 5 】

本発明の別の特徴は、EITなどの画像技術を用いて細胞塊のインピーダンスの

(21)

特表2003-505073

変化を検出できることである。

【 0 0 3 6 】

本発明のまた別の特徴は、EITを用いて組織のある領域のインピーダンスをマッピングできることであり、これにより、細胞塊の細胞インピーダンスの変化を検出して所定の電氣的パラメータ（例えば電流および／または電圧）を調整し所望のエレクトロポレーションを得ることができる。

【 0 0 3 7 】

本発明における上述およびその他の特徴、利点、および目的は、後述の説明によりさらによく理解されられると思われる。

【 0 0 3 8 】

発明の説明および態様

本発明の装置およびエレクトロポレーションの実施法を含む方法を説明する前に、方法および装置は無論さまざまに異なりうるものであるから、本発明は特定の方法および装置に限定されるものではないことが理解されなければならない。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲でのみ限定されるものであり、したがって、本明細書中の用語は具体的な態様を説明する目的でのみ使用され、本発明を限定するものではないことも理解されなければならない。

【 0 0 3 9 】

ある範囲の値が示される場合、その範囲の上限および下限の間にある各値は特に断りがない限り下限の単位の10分の1まで具体的に開示されるものと理解される。定められた値または定められた範囲中の値と、別の定められた値またはその定められた範囲中の別の値との間の小範囲は、すべて本発明に含まれる。これら小範囲の上限および下限はその範囲に入っても入ってなくてもよく、小範囲に上限および下限のいずれかまたは両方が含まれるか、またはいずれも含まれない場合の範囲もすべて本発明に含まれ、定められた範囲に特定の除外される限界がある場合はその対象となる。定められた範囲が一方または両方の限界を含む場合、これら含まれる限界のいずれか一方または両方を除外した範囲も本発明に含まれる。

【 0 0 4 0 】

(22)

特表2003-505073

特に断りがない限り、本明細書中の技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されているのと同じ意味を持つ。本発明の実施または検証においては本明細書に記載のものと類似または同等のあらゆる方法および物質が使用可能であるが、以下に好ましい方法および物質を説明する。本明細書中に挙げる刊行物は、その刊行物と共に引用される方法およびまたは物質を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる。

【 0 0 4 1 】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる名詞の単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」および「その (the)」は、特に断りがない限り複数形も含む。したがって、例えば、「1つの生物細胞 (a biological cell)」という表現には複数の生物細胞が含まれ、「電極 (an electrocode)」という表現には1つまたは複数の電極および当業者に既知の同等物が含まれる。他の表現も同様である。

【 0 0 4 2 】

本明細書中で言及される刊行物は、本発明の出願日より前の開示の目的でのみ提供される。本明細書に記載事項のいずれも、本発明が先行発明によりこれら刊行物の日付を実際より早める権利を有しないことの承認として解釈されるものではない。さらに、提供される発表日は実際の発表日と異なる可能性があり、独立した確認を要する場合がある。

【 0 0 4 3 】

定義

「電極」という用語は、その電極から他の電極に電流を生じさせるために用いられる、あらゆる導電性物質を意味し、好ましくは金属、最も好ましくは非腐蝕性の金属を意味する。「導電性」とは、例えば電流または電圧などあらゆる形で参照されうる電気的な流れを伝えることを意味する。電極は種々の異なる導電性物質で製造され、合金でも純粋な金属であってもよく、銅、金、プラチナ、鉄、銀、塩化銀などであってもそれらの合金であってもよい。さらに電極は、超小型回路で使用されるシリコンを基礎とした物質など、導電性の非金属を含んでいてもよい。組織のエレクトロポレーションに用いられる典型的な電極は、好ましく

(23)

特表2003-505073

は、ロッド形、平板形、または中空針形の構造体である。電極は電流を連続的に伝えてもよく、またはパルスで伝えてもよい。電極はその用途に非常に特異的であってもよく、ステンレス鋼の平行プレート、埋め込みワイヤ、ペアになった針、および針のアレイからなってもよい。当業者は、本発明に従って望ましいエレクトロポレーションを行うのに特に有用な専用の電極を設計することができると考えられる。

【 0 0 4 4 】

「組織」という用語は、複数の細胞を意味する。細胞は同一種類のものでも複数の異なる種類のものでもよい。これらの細胞は好ましくは特定の機能を果たすように組織化されたものである。組織には、生きている生物中の組織も生きている生物から取られた組織も含まれ、また、インビボのものを指すこともインビトロのものを指すこともある。さらに組織は、植物および動物を含むいかなる生物に由来するものでも、または、遺伝子工学を用いてつくられたものでもよく、したがって人工的な起源のものでもよい。1つの態様では、ヒトのある明確な領域に存在する複数の細胞が組織である。

【 0 0 4 5 】

「装置」および「エレクトロポレーション装置」という用語は、本明細書中で互いに置き換え可能であり、本明細書を通して開示および記載されるあらゆる装置を指す。装置は、好ましくは第一の電極および第二の電極を含み、第一および第二の電極がそれぞれ正および負の電荷をもつ様式で電源に接続される装置である。また装置は、好ましくは、1つまたは複数の特定の開口部を通る電気の流れ以外は2つの電極間の電気の流れを妨げる手段を含む。例えば流れを妨げる手段は、1つまたは複数の開口部を有する非導電性物質で開口部が1つまたは1群の生物細胞を捉えるように特別に設計されたものでもよい。これにより、電流は必ず開口部と細胞を通して他方の電極に届く。また装置は、好ましくは電極間の電流の流れ方を測定する手段を含む。測定的手段には、電圧計、電流計、または任意の様式で電気の流れを測定することができる当業者に公知のあらゆる装置が含まれる。さらに、装置は好ましくは電極間の電気の流れの量を調整する手段を含む。これにより、最適のエレクトロポレーションが得られるように、測定した電

(24)

特表2003-505073

気の流れに基づいて、電圧、電流、またはその他電気の流れに関する所望のパラメータを具体的に調整することができる。「エレクトロポレーション」という用語が用いられる場合は、薬剤またはDNA配列などの化合物を細胞内へ移動させるために装置が用いられることを必ずしも意味してはいない。

【0046】

「パワー源」、「電源」、および類似の用語は本明細書中で互いに置き換え可能であり、電力、電流、または電圧を供給しそれにより電極間に電気の流れを生じさせるあらゆる手段を指す。装置は好ましくは制御されたモードと振幅を供給できる能力を有し、一定のDC電流またはAC電流を供給し、またパルス電圧または連続電圧を供給することができる。装置は、好ましくは電圧、ランプ電圧、ランプ電流、またはその他の組合せを指数関数的に減衰できる能力を有する。電源は例えば、マイクロプロセッサで使用されるタイプのチップと組合せて使用することも、110Vの交流電流を供給する通常の一般用電源で高速増幅を実現することもできる。パルス形状は、LabViewプログラム上で動作しその出力をパワー増幅器に入力することができるToshibaラップトップなどのマイクロプロセッサで生成することができる。幅広いさまざまな市販の電源で所望の機能を得ることができる。通常、エレクトロポレーションのために供給される電位は、組織中の対象領域に生じ単位V/cmで定義される電圧勾配として表される。その範囲は10 V/cm～100,000 V/cmの範囲を含み、好ましくは100 V/cm～10,000 V/cmである。しかし、この範囲は増幅のしかたによるものであり、所望の用途に応じてこれに外れてもよい。電気パルスの範囲は一般にマイクロ秒～ミリ秒である。しかし、所望の結果に応じて他の範囲のパルスを使用してもよい。

【0047】

発明の全体像

本発明は様々な構造、方法、および用途に適用することができるが、以下に本発明に固有の構造および方法を詳しく説明する。この説明により本発明の全体的な概念が明らかになると思われる。

【0048】

本発明の方法は、幅広い様々な装置およびシステムを使用してを実施すること

(25)

特表2003-505073

ができる。装置は、第一の電圧を有する第一の電極および第二の電圧を有する第二の電極を含んでいなければならない。さらに装置は、電極間の荷電粒子の流れを検出する手段、および、電極間の荷電粒子の流れの変化を検出して得られたデータに基づいて電極間の電流を変化させる手段を含む。好ましくは、装置はさらに、第一および第二の電極間に置かれた1つまたは複数の生物細胞を通る以外の電極間の荷電粒子の流れを妨げるか、または大幅に減少させる部品を含む。

【0049】

媒質中に存在する細胞に所望の物質を移動させるため、その物質を媒質に添加することができる。また本発明は、細胞中に移動させる物質を媒質に加える段階を必ずしも含まない。本発明の方法は、印加した電流に基づいて細胞膜に生じた変化を測定するためだけに実施することも可能である。この情報は媒質中に存在する細胞または細胞群の特性を決定するのに有用となりうるし、特に、正常細胞および異常細胞の情報との比較に、または以前に検査後の細胞と現在検査中の細胞との違いの決定に、使用することができる。

【0050】

最初に述べる構造は、1つの生物細胞を保持するための支持体と、電気セル内の電気の流れをその生物細胞を通る経路に限定する仕切りとを内部に持つ、エレクトロポレーションセルである。電圧が印加されていないときは、電圧による孔形成を行わない単なる拡散輸送にこの構造を用いることができる。

【0051】

仕切りおよび2つの槽を使用する態様における2つの槽を含む構成は、本発明において不可欠なものではなく、様々に異なっても本発明の目的および利点を達成しうる。ただし、生物細胞は大きさが顕微鏡レベルであるため、様々な各形態で本発明を実施するための器具として好ましいのは、構造全体および/または槽の大きさがマイクロファブリケーション技術でつくられる電子チップのサイズであるものである。マイクロファブリケーション技術としては例えば電子チップ製造で用いられている技術がある。さらに、槽がフロースルー槽になっていて、連続流、間欠流、または使用者の指示による流入で液体を通過させることができ、且つ生物細胞の細胞膜を通過する化学種を精密に制御するため必要に応じて濃

(26)

特表2003-505073

度、圧、およびその他の条件を変えることができることがより好ましい。したがって、この器具の好ましい構造および製造方法の1つは、接合されたときに流路を形成する適切な開口部を持った層または小板で器具を構築するものである。

【0052】

フロースルー槽には、個々の細胞を連続で投入および除去させることができ、したがって大量の細胞を連続処理できるという利点がある。またフロースルー槽では溶液の溶質が減少した場合に補充が可能であり、したがって必要に応じて濃度勾配を連続的に維持することができる。フロースルー槽がもつさらなる機能の1つは圧の増加と減少である。この機能は以下に説明するように様々な目的において有益となる。

【0053】

この構造における生物細胞の支持体は、生物細胞をある位置に固定し、電流の通過を可能にするような任意の構造であり得る。最も便利な支持体は、仕切りに設けられた開口部である。開口部に生物細胞を固定することにより、開口部が閉鎖、密閉、または塞栓され、これにより電流、拡散輸送、またはその両方の経路が細胞を通ることになり、細胞周囲の漏れはなくなるかまたは最小限に抑えられる。これを達成するのに便利な機械的手段の1つは、開口部を挟んで、開口部に細胞を押し付ける方向に圧差をかけることである。開口部の直径は細胞の直径より小さくする。器具に入った細胞は2つの槽のどちらかに入る。細胞の入った槽の圧を高くするか、あるいは他方の槽の圧を下げることにより、細胞が開口部に押し付けられ開口部をふさぐ。処理が完了したら、2槽の圧を等しくするか、または圧差を逆にして細胞の入った槽より他方の槽の圧を高くすることにより、細胞は容易に開口部から離れる。細胞の入った槽の液体の流れにより細胞が開口部から除去され、開口部には別の細胞が固定できるようになる。

【0054】

開口部を細胞で密閉する別の方法は、細胞膜に結合する物質で仕切りの表面または開口部の縁に被覆を施すことである。生物細胞の細胞膜は負に帯電しているため、被覆にはポリリジン、ポリアルギニン、またはポリヒスチジンなどの正に帯電する物質を用いることができる。生物細胞は開口部を挟んだ圧差によって開

(27)

特表2003-505073

口部に導かれ、そこで被覆によって保持される。処理が完了したら、開口部の細胞側の槽の液体の流速を瞬間的に増加させることによって、または開口部を挟んだ圧差を逆転させて開口部から細胞を動かすことによって、細胞を被覆から離すことができる。

【 0 0 5 5 】

開口部の大きさは、望ましい程度の物質輸送、電流の通過、またはその両方を制御可能かつ経済的に妥当な時間内に達成するのに十分な表面積を細胞膜上に確保できるかぎり、本発明において特に重要ではない。したがって、最適な大きさは処理あるいは研究しようとする特定の細胞ごとに異なるであろう。一般的に、開口部は好ましくは円形またはほぼ円形であり、直径は細胞の大きさによって異なり、好ましくは約1ミクロン～約100ミクロン、より好ましくは約1ミクロン～約50ミクロン、最も好ましくは約2ミクロン～約20ミクロンである。2つの槽を隔てる孔のあいた仕切りは、好ましくは、水にも溶質にも不浸透性で、細胞を開口部に固定するのに十分な圧差を保持できる硬質の誘導体物質である。マイクロファブリケーション技術で製造される装置では、仕切りの材料として便利なのは窒化ケイ素である。同様に機能する他の材料は当業者に容易に明らかになるであろう。

【 0 0 5 6 】

本発明の好ましい態様におけるさらなる特徴は、透明な物質で作られた器具の使用である。これにより使用者は、細胞内部および微量拡散とマイクロエレクトロポレーションが起こる工程を顕微鏡で観察できる。

【 0 0 5 7 】

インビボ治療におけるエレクトロポレーションの使用

本発明のエレクトロポレーション技術は、哺乳類およびヒトを含む、治療を必要としている生物の治療、分析、または診断において有用である。治療は一般的に、治療しようとする組織の領域に物質を連続注入あるいは急速大量投与して行われる。その組織の近傍に電極を設置し、電流または電圧を連続的に印加および測定して、望ましいレベルのエレクトロポレーションが実施され注入された物質が治療しようとする組織の細胞中へと移動できるようになったかを調べる。

(28)

特表2003-505073

【0058】

注入する薬学的活性化合物は、低分子と通常呼ばれる従来の薬剤でも、蛋白質または蛋白質をコードするヌクレオチド配列であってもよい。さらに、組織に注入する構成物の投与は、エレクトロポレーション装置から電気パルスを印加する前でも、印加中でも、さらには印加後でもよい。本方法の全体的な目標はエレクトロポレーションによって孔をあけ、通常は細胞膜を通過しない化合物を細胞内に導入することである。例えば、プレオマイシンまたは種々の遺伝子構造体および/もしくはプラスミドを、治療しようとする組織の細胞に導入することができる。これは、治療しようとする組織中の細胞に電位と電流を生じさせることによって実施され、このとき電位は電気パルスとして生成される。パルスを生成するには1つの電極より複数の電極を使用するほうが好ましい。

【0059】

有用な電極デザインの1つの例は、幅10 mm、厚さ0.6 mmの2つの平鋼ストリップを含むものである。2つの電極は約6~7 mm離れており、この距離は固定されている。第二の電極デザインは、2つ~最大8つの20 mmの正方形平鋼を含むものである。電極はPS15電気パルセータに接続される。パルスは、平面側を皮膚に当てることによって、あるいは電極を皮膚腫瘍の周囲に置くことによって伝えられる。皮膚との接触には、導電性ゲルまたは食塩水など、心電図計測に従来から用いられている物質を使用することができる。本発明の方法を実施するには患者に1つまたは複数のパルスを与えることができ、好ましくは複数のパルスを与える。人体の内部など生物内部の組織にエレクトロポレーションを行うには、すなわち皮膚の外に電極を置かずに実施するには、様々な構成が可能である。このような構成は複数の針電極を含む針アレイで構成することもできる。1例として、陽電極および負電極はそれぞれ、直径0.5 mmでステンレス鋼からなり、長さ1 cmの6本あるいはそれ以上の針で構成され、BTX 820パルスジェネレータに接続される。この電極を平行に組織に挿入し、エレクトロポレーションを行おうとする細胞の周囲に設置することができる。電極は範囲5 mm~1 cmの任意の直径で円形に配置することもできる。レンジ約1300 V/cmの電圧電極比を使用することができる。与えるパルスの数はいくつでもよいが、インターバル1秒間、パルス幅100マ

(29)

特表2003-505073

イクロ秒の約6パルスで始めるのが好ましい。本発明は、細胞内に導入された物質を追跡するための色素および標識を使用することなくエレクトロポレーションが生じたかどうかを決定することができる点で、組織のエレクトロポレーションに特に適している。

【0060】

図6aおよび図6bに示すように、電流は細胞周囲を通り（図6a）、エレクトロポレーションが生じた後は細胞の中を通る（図6b）。本発明の方法により、図6aの状態と図6bの状態の中間の移行期がいつ起こっているかを決定することが可能となり、またさらに、細胞膜に不可逆的な影響が生じるのを避けることが可能となる。図8aに示すように、エレクトロポレーションを強く行くと、細胞膜が損傷されその結果、不可逆的な影響が生じることがある。一般的にこれは好ましくない。しかし、電流の量を調整することにより、細胞膜に有意な損傷を与えることなくエレクトロポレーションを行うことができ、従って図8bに示すような可逆的な状態を得ることができる。

【0061】

図6aおよび図6bに示すように、細胞は電気インピーダンスを生じ、本発明はこの電気インピーダンスの程度を正確に測定すること、および、エレクトロポレーションで所望の結果が得られるように電流を調整することに関する。しかし、組織中のように多数の細胞が関与する場合は、組織中の複数のセルにエレクトロポレーションを行う上で電流のその他の影響を測定する別の機構を用いるのが好ましいことがある。電気インピーダンスは電気がある物質をどのように通過するか of 尺度である。電気インピーダンスは物質ごとに異なり、物質の電氣的組成で決定される。電気インピーダンスの高い物質もあれば低い物質もある。悪性疾患のある（癌性の）乳房組織は、正常組織または良性（癌性でない）腫瘍より電気インピーダンスが大幅に低い（電気をよく通す）。

【0062】

インピーダンスは端子間に電圧がかけられたときに電気回路が電気の流れにどの程度抵抗するかという尺度である。インピーダンスは、1組の端子間を流れる電流に対する、端子間にかけられた電圧の比であり、オームで表される。直流（

(30)

特表2003-505073

DC) 回路ではインピーダンスは抵抗に相当する。交流 (AC) 回路では、インピーダンスは抵抗、インダクタンス、およびキャパシタンスの関数である。インダクタおよびキャパシタは電流の流れと逆向きの電圧を蓄積する。この対抗性はリアクタンスと呼ばれ、これと抵抗との組合せでインピーダンスが定義される。インダクタンスにより生じる抵抗はAC電流の周波数に正比例し、キャパシタンスにより生じるリアクタンスは周波数に反比例する。

【0063】

上述の基本概念は本発明の基本的な局面で利用され、電気インピーダンストモグラフィ (EIT) ととも呼ばれる電気インピーダンス画像法を説明するのにも適している。同じ技術を説明するのに多数の異なる用語が使用されうることが注意を要する。電位印加トモグラフィ (Applied potential tomography : APT) もその1つである。これらの画像技術により、生物組織の電気的特性の空間的変動に基づく画像を得ることが可能である。APTおよびEITなどの技術を利用して、組織において本発明を実施することができる。電位印加トモグラフィ (APT) の物理的基礎は、生物物質表面の2点間に電流を印加したときの表面の電位分布の測定である。他の研究者らもこの技術を利用しており、電気インピーダンス画像法、導電性画像法、電気インピーダンストモグラフィなどの名称で呼んでいる。本明細書においてはこの技術を主にEITまたは電気インピーダンストモグラフィと呼んでいる。したがって、以後の開示ではこの技術をEITとのみ称し、実施例3にその1例を示す。

【0064】

本開示を読んだ当業者は、電流の変化を測定するための様々な方法を考えるであろう。組織に対して本発明を実施する際にこれらを測定するための好ましい方法の1つは画像技術を用いることであり、具体的には試料の生体電気的特性の差異をモニターし、分析して、画像を生成する電気インピーダンストモグラフィ (EIT) を用いることである。本発明においては、EIT画像を生成し、所望の結果を得るためにこの画像を用いて電流を調整することにより、EIT技術を利用することができる。具体的には、組織中に電流を流し、その結果生じる電圧を電極アレイで測定することによってEIT画像が生成される。これにより、再構成アルゴリ

(31)

特表2003-505073

ズムを用いて、既知の入力電流と測定された入力電圧データからインピーダンス画像を生成することが可能になる。EIT画像では電気インピーダンスのマップが得られるため、この点において、本発明を組織に適用するうえでEIT技術は特に好適である。電気インピーダンスのマップにより、本質的に、使用者はエレクトロポレーションがいつ開始されたかを視覚化することができる。エレクトロポレーションが開始されたら、使用者は印加する電流の量を安定化させることができ、これによって、図8aに示すような不可逆的な損傷を細胞に生じさせるような多量の電流の印加を回避することができる。EIT技術により、モニターしている組織中の細胞の電気インピーダンスの変化に基づいて、組織中のエレクトロポレーションを行う領域を視覚化することが可能になる。

【 0 0 6 5 】

図7は、組織試料71に対して本発明の方法を行うのに用いられる、EITシステムの概念図である。電流源72はシグナル発生器73によって制御され、コンピュータ制御された1組のマルチプレクサ74、75を介して組織試料71に電流を流すために使用される。マルチプレクサ74、75は、差動増幅器76と復調器77に接続される。測定されたシグナルは元のシグナルと比較され、後の画像構成のために振幅と位相のデータが記録される。制御用コンピュータ78は、典型的には、どの電極ペアから電流を流すかを選択しながら他の電極の電圧を読み取る。本発明で利用できるハードウェア構成はこの他にも多数存在する。

【 0 0 6 6 】

図7に示すEITシステムは、電流源および測定用増幅器が1つであることから一般的にシリアルシステムと呼ばれる。他のシステムでは、様々な程度の並列化（複数の電流源および電圧測定用増幅器）を用いることにより電流注入システムの柔軟性およびスピードの向上が図られている。

【 0 0 6 7 】

再構成アルゴリズムは、体の関心対象の領域の外側表面で測定した電圧（印加した電流のデータ）と電極形状に関する情報から、組織71の領域内の組織インピーダンスの空間分布を表す画像を生成するのに用いられる。インピーダンス画像の生成に使用できる方法は多数ある。静的画像法は絶対インピーダンスの分布を

(32)

特表2003-505073

描出するものである (Cook, R. D. ら, 「ACT3: 高速高精度電気インピーダンス トモグラフィ (ACT3: a high speed, high precision electrical impedance tomography)」 IEEE, Trans. Biomed. Eng. 41, 713-22 (1994))。差分画像法は2つのデータセットの差に基づいて分布を描出する (Barber, D. C., 「バイオ メディカルエンジニアリングの進歩 (Advances in Biomed Eng.)」 (Benek in, W., Thevenin, V. 編) 165-173 (IOS Press, Amsterdam, 1995))。この種の 技術では、インピーダンス分布があるベースライン測定からどのように変化した かを表す画像が得られる。多周波インピーダンス画像法は、組織インピーダンス の周波数依存性を利用するものである (Groffiths, H., 「電気インピーダンス トモグラフィにおける位相測定の重要性 (The importance of phase measurement in electrical impedance tomography)」 Physics in Medicine and Biology 32, 1435-44 (1987))。準静的画像は、低周波数画像をベースラインとしてこ れらの差分技術を用いて生成することができる。したがって、このシステムによ り、真の静的画像における困難を伴うことなくある種の静的画像を得ることが可 能になる。

【 0 0 6 8 】

再構成そして画像化を行うため、組織中で電流がどのような挙動を示すかとい う数学的モデルが使用される。一般的に、EITにおける電流の流れに適用される モデルは、よく知られているポワソンの方程式で得られる。EIT画像再構成およ び他の多くの医用画像技術で必要とされる数学的分析法は、大きくは境界値問題 として知られる種類に属する。境界値問題を解く方法は多数あるが、これらはす べて分析法または数値反復法のいずれかに分類することができ、当業者は本発明 の実施に当ってこれらを適用することができる。

【 0 0 6 9 】

現在用いられている再構成アルゴリズムの大多数は、ポワソンの方程式に対し て反復解法を用いたものである。反復アプローチの多くは、組織中のインピーダ ンス分布を推定して順問題を繰り返し解き (あるインピーダンス分布における電 圧密度および電流密度を算出)、それに応じてインピーダンスの推定値を調整し 、電圧および電流の測定値が計算値と一致するまでこれを行うことによって境界

(33)

特表2003-505073

値問題を解こうとするものである。順問題は数値的に解く必要があり、有限要素法または差分法が用いられるのが普通である。FEM（有限要素法）は順問題を解く上で非常に強力によく用いられる方法であり、このため、多くの学際的分野で技術的解法として最も広く使われる傾向にある。

【0070】

本発明に従って単一の細胞に対して電場をかけずに細胞膜を介した物質輸送を行う場合に適した微量拡散器具の一例を図1に示す。この器具の部品は、下から順に、アクリル製ベース11、2つの液体槽のうち下の槽の側面となる彫り込み部位13をもつシリコン製中間層12（厚さ1ミクロン）、2つの槽の仕切りとして機能する窒化ケイ素層14、上部液体槽16の側面となるシリコンワッシャ15、および、ガラス製カバープレート17である。窒化ケイ素の仕切りにあけられた穴18は開口部として機能し、図中には1つの細胞あるいは組織のように連続した細胞塊19がこの穴をふさいでいる様子を示している。アクリル製ベースを通るチャネルは、図中に矢印で示すように、上槽および下槽を通る液体の流入路および流出路として機能する。

【0071】

上槽16内の圧が下槽13内の圧より高い場合、細胞は穴の上に保持され、2つの槽の液体を隔てる栓として機能する。2槽の溶液の組成が細胞内のそれと異なる場合は、細胞膜を介して槽と細胞との間で物質輸送が生じる。一方の槽の溶液の組成が他方の槽のそれと異なる場合は、細胞を介して槽と槽との間で物質輸送が起こる。2つの槽の溶液の組成を正確に制御することにより、セル内の物質輸送の速度と方向を正確に制御することができる。穴18の直径は既知であることから、この穴を通る物質輸送を正確に決定することができる。

【0072】

この微量拡散装置がもつ数多くの用途は容易に理解されるであろう。例えば、この装置を用いてグリセロールなどの凍結保存剤を細胞内に注入することが可能であり、それには上槽16を生理食塩水で、下槽13をグリセロールでそれぞれ満たす。細胞膜を介したグリセロールの物質輸送係数がわかっている細胞19を用いる場合は、セルに浸透するグリセロールの量を計算して、凍結保存に必要な量を細

(34)

特表2003-505073

胞に注入するための濃度および曝露時間を容易に調整できる。

【0073】

単一の生物細胞に本発明を適用する場合のマイクロエレクトロポレーション器具の1例を図2に示す。この器具の構造は図1の微量拡散器具と似たものである。その部品構成は、下から順に、アクリル製ベース21、下部液体槽23の側面となる彫り込み部位をもつ下部シリコン層22、2つの槽の仕切りとして機能する窒化ケイ素層24（厚さ1ミクロン）、上部液体槽26の側面となる上部シリコン層25、および、 n^+ ポリシリコン層（厚さ5,000 Å）27、および窒化ケイ素層（厚さ1ミクロン）28を含むガラス製カバーである。窒化ケイ素の仕切り24にけられた穴29は開口部として機能し、1つの細胞30（または細胞塊）がこの穴をふさぐ。アクリル製ベースを通るチャンネルは、図中に矢印で示すように、上槽および下槽を通る液体の流入路および流出路として機能する。さらに、アクリル製ベース21の上に n^+ ポリシリコンの層（5,000 Å）31があり、この層は、上槽26の上にある n^+ ポリシリコン層27とともに2つの電極として機能する。各電極は、電極間に印加する電圧の制御と電極間を通る電流の測定とを行うプリント回路基板32に導線で接続される。

【0074】

図2に示すマイクロエレクトロポレーション器具は、典型的には化学蒸着、マスキング、エッチング、およびスパッタリングで用いられている従来のマイクロファブリケーション技術で作製することができる。この器具の動作は図1の微量拡散器具の動作と類似している。器具内の生物細胞の移動は上槽用の液体に細胞を懸濁することにより実施され、細胞は2つの槽に圧差をかけることによって1度に1つずつ開口部に導かれ、開口部に導かれた細胞はこの開口部に保持される。このような圧差をかけるのに便利な方法の1つは、下槽に注射器を取り付け、上槽を大気圧に維持したまま注射器のピストンを引くことによって下槽の圧を大気圧未満に下げることである。細胞を損傷しないところまでに圧差をとどめるように注意が必要である。

【0075】

図3aおよび図3bは、本発明の範囲内の別の器具および方法を示したものである

(35)

特表2003-505073

。この器具と方法では、コンジットまたはフローチャネルを流れる生物細胞の懸濁液が使用され、細胞はコンジットまたはフローチャネルを通る際に1組の電極に挟まれた領域を通る。縦断面図である図3aは、チャネルの壁41およびチャネルの内腔を下方に向かって（矢印の方向に）通過する生物細胞42を示している。横断面図である図3bはチャネルの断面が長方形であることを示しているが、他の断面形状であってもよい。電極43、44はチャネル内で対面する2つの壁に被覆として形成される。電極は、インピーダンスの測定と電極に印加する電圧の制御とを行うプリント回路基板45に導線で接続される。生物細胞42は、2つの電極に挟まれた領域を通過しているものとして示されている。

【0076】

チャネルの断面積は、細胞が実質的にチャネル壁に妨げられることなく通過するように十分に大きく、かつ、電極間の領域を1度に通過する細胞が1つのみとなるように十分に小さい。さらに、電極間の領域に細胞が入ると、電極間に印加された電圧によってこの領域を通過している電流が有意にすなわち測定可能なだけ減少するように、電極43、44の長さは生物細胞の直径とほぼ等しいかそれよりわずかに大きくする。同様に、電極のスペーシングすなわち電極間の距離にも同じ考慮が必要である。生物細胞は、細胞内に導入しようとする化学種の溶液に懸濁し、この懸濁液をチャネルに通す。懸濁液がチャネルを通るときにある電圧を電極に印加し、電極間の電流（あるいはインピーダンス）をモニターする。電流の有意な低下は、電極間の領域に生物細胞が存在することを示す。このように細胞が検出されたら、電極間の領域に細胞がある間にエレクトロポレーションパルス電極に印加し、引き続きインピーダンスをモニターすればエレクトロポレーションの開始を検出することができる。エレクトロポレーションの結果、溶液に溶解されている化学種が細胞内に入る。

【0077】

当業者にはこれらの構造および方法に対する変更が容易に明らかになるであろう。例えば、前述の仕切りは、生物細胞と同じ大きさまたはそれより小さい微小電極を用いることによって最小化あるいは排除することが可能である。このような微小電極の例として、高精度マイクロマニピュレータ（例えば東京、ナリシゲ

(36)

特表2003-505073

から入手可能なMWH-3) で用いられるカーボンファイバー微小電極 (例えばProCF E、米国カリフォルニア州フォスターシティ、Axon Instruments) がある。微小電極は、図2あるいは図3aおよび図3bに示す電極の代わりに使用することができる。

【0078】

実施例

以下の実施例は、本発明をどのように利用するかについての完全な開示と説明を当業者に提供するためのものであり、本発明者らが発明であると考える範囲を限定するものではなく、また以下の実験が実施された全ての実験または実施された実験のみであることを示すものでもない。示した数字 (例えば量、温度など) は正確であるように注意を払っているが、いくつかの実験上の誤差および逸脱は考慮に入れられるべきである。特に断りがない限り、部分は重さによる部分であり、分子量は平均分子量であり、温度の単位は摂氏であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。

【0079】

実施例 1

上述および図2に示したマイクロエレクトロポレーション装置を用い、上槽および下槽に循環させる液体用の流速圧力制御ユニット、および圧力計、可変DC電源、装置に電圧パルスをかけるためのパルスジェネレータおよびパワー増幅器、パルスをモニターするためのデジタルオシロスコープ、蛍光顕微鏡、CCD (電荷結合素子) カメラ、ならびに画像処理ソフトウェアおよび波形処理ソフトウェアを備えたコンピュータと組合せたマイクロエレクトロポレーションシステムを用いて、一連の実験を行った。装置の2つの槽を生理食塩水で満たし、上槽に細胞を入れた。上槽および下槽の液体の移動は注射器で行った。上槽内の圧力は大気圧とし、下槽内の圧力は下槽に接続した注射器の筒を引くことによって大気圧より低くした。電圧は強さ0~120 V、持続時間2マイクロ秒~100ミリ秒の範囲の単一矩形波で印加した。上槽および下槽の電極間の距離は900ミクロンとした。

【0080】

この実施例の試験では、典型的な直径が20ミクロンのND-1ヒト前立腺癌細胞を

(37)

特表2003-505073

用いて行った。マイクロエレクトロポレーション装置の開口部は直径5ミクロンとした。持続時間60ミリ秒の矩形電圧パルスを印加し、パルスは10 Vから60 Vまで5 Vずつ振幅を上げて変化させた。各パルスについて開口部を通過する電流を測定した。実験は細胞について行い、ガラスビーズで開口部をふさいだ場合および開口部に障害物を置かない場合の両方について行った。それぞれの場合の結果をパルス振幅のボルトに対する電流のマイクロアンペアで表した。これをプロットしたものが図4であり、一番上の曲線（xで示したデータポイント）は開口部を閉鎖しなかった場合、一番下の曲線（アスタリスクで示したデータポイント）は開口部にガラスビーズを置いた場合、中間の3本の曲線（中抜き四角、中抜き正位の三角、および中抜き逆位の三角）はそれぞれ異なるND-1細胞を開口部に置いた場合のデータを示す。

【 0 0 8 1 】

一番上の曲線は、開口部を通る電流の流路に障害物がない場合、電圧の増加に伴って実質的に安定して電流が増加することを示す。一番下の曲線も、程度ははるかに低いものの、電圧の増加に伴って実質的に安定して増加することを示す。一番下の曲線の電流値は装置を流れる迷走電流を示す。開口部にND-1細胞を置いた場合の曲線から、低電圧では電流値が開口部をガラスビーズでふさいだ場合の値に近いが、高電圧で場合は電流値が開口部をふさがない場合のレベルまで上昇することが示される。その変化は急激な上昇となっており、このことは細胞膜に電流が通過できる孔が形成されたこと、すなわちエレクトロポレーションの開始を示唆している。3つの細胞すべてにおいて、この変化は電圧30 V～40 Vの電圧で起こった。3つの細胞のうち2つ（中抜き四角および中抜き正位の三角）では、本質的に同じ電圧でエレクトロポレーションが開始されたが、3つ目の細胞（逆位の三角）では、他の2つより約5 V低い電圧でエレクトロポレーションが開始された。このことは、最適の結果を得るためには個々の細胞ごとに工程を調整することの重要であることを示している。

。 【 0 0 8 2 】

図4のデータが得られた後、振幅を減少させながらパルスを再印加した結果、曲線はヒステリシスを示した。すなわち、振幅を漸減した場合に得られる曲線で

(38)

特表2003-505073

は、漸増した場合に得られる曲線より電圧が高くなった。このことはこれらの実験におけるエレクトロポレーションは不可逆的に起きたことを示している。

【 0 0 8 3 】

実施例 2

実施例1で使用したのと同じマイクロエレクトロポレーションシステムを用いて、細胞の典型的な直径は20ミクロンであるラット肝細胞 (ATCC #CRL-1439) に対して一連の実験を行った。マイクロエレクトロポレーション器具の開口部は直径4ミクロンとした。実施例1と同様に持続時間60ミリ秒の矩形電圧パルスを使用した。振幅は10 V～37.5 Vとし、10 V～30 Vでは5 Vずつ、30 V～37.5 Vでは2.5 Vずつ増加させた。実験の一部は振幅の漸増のみで行い、一部は振幅を最初に漸増し次に漸減して可逆性を評価した。結果は図5a、図5b、図5c、および図5dに示したグラフに表示する。各グラフにおいて、一番上の曲線 (円で示したデータポイント) は開口部に細胞もガラスビーズも置かなかった場合、一番下の曲線 (四角で示したデータポイント) は開口部にガラスビーズを置いた場合、中間の曲線 (三角で示したデータポイント) は開口部に肝細胞を置いた場合のデータであり、4枚の図はそれぞれ別の肝細胞を用いたデータである。

【 0 0 8 4 】

図5aでは、振幅は漸増のみで漸減は行わず、エレクトロポレーションの閾値電圧は25 Vと30 Vの間を示した。図5bおよび図5cでは、振幅をまず漸増させ次に漸減して、中間の2本の曲線を得た。漸増時の曲線と漸減時の曲線を区別していないが、各図において両者は実質的に同一であり、このことは各々の場合において各電圧パルスの後に細胞膜が再度塞がれたこと、したがってこの場合の孔形成が可逆的であったことを示している。図5dに示した試験では、図には示していないが、印加電圧が37.5 Vを超えると細胞が崩壊した。図5a、図5b、図5c、および図5dのそれぞれで同じ種類の細胞を使用したにも関わらず、エレクトロポレーションの閾値電圧が、すべて20 V～35 Vの範囲に入っていたとはいえ個々の細胞ごとに異なっていたことは注目に値する。このように電流をモニターして、どの時点でエレクトロポレーションの閾値が生じるかに注目することによって、個々の細胞にあわせた処置を容易に実施することができる。このシステムにおける最適な

曝露時間、電圧、周囲の液体中の組成の変化、および他のパラメータを選択することにより、細胞を破壊することなく所望の処理を行うことができる。

【0085】

本明細書に記載した方法は、実験室では生物細胞のエレクトロポレーション特性の基礎研究を行う上で有用なツールであり、産業においても大量の細胞をフロースルー方式で処理する上で有用なツールである。個々の細胞を流れる電流の観察と記録を可能にすることによって、電圧パルスの振幅と持続時間を制御して最適の結果を得ることが可能となる。さらに本明細書に示した本発明の実施に用いる装置は、透明な部品を用いて、顕微鏡のステージに固定するのに適したサイズで構成することができる。これにより、電流の測定値を細胞内部の視覚的観察結果および蛍光の測定値と相関させることが可能となる。本装置を用いて、細胞膜の孔形成が起きた時点および細胞が開口部に引っかかった時点を、電流の測定により電氣的に検出することができる。より大規模で産業的な用途には、本明細書で記載した種類のマイクロエレクトロポレーション装置を多数並列に配置することができる。各細胞について、開口部に細胞が捕捉されたことを示す電氣的情報（電流の急激な低下など）を利用してエレクトロポレーションを連続的に開始するシグナルを生成することができ、さらにエレクトロポレーションの完了を示す電氣的情報（電流の急激な上昇など）を利用して、その細胞を（例えば圧差を消失または逆転させるなどして）解放し次の細胞を開口部に導くシグナルを生成することができる。

【0086】

本発明の装置およびシステムは、細胞内または細胞外へ物質を移動させる用途に加え、診断または分析の様式でも使用することができる。これは媒質中に入れた1つまたは複数の細胞の電気インピーダンスを測定し、この測定した電気インピーダンス情報を利用することによって行われる。細胞膜の完全性に関する情報を導き出すことが可能であり、したがって分析に用いることができる。また、その情報を同じ種類の正常細胞または異常細胞で以前に取得した情報と比較することが可能であり、したがって診断情報を得ることができる。例えば、無傷の細胞膜を持つ細胞の電気インピーダンスは細胞膜が損なわれた同じ細胞のインピーダ

(40)

特表2003-505073

ンスよりはるかに高い。このように、本工程から分析的に細胞膜の構造上の完全性に関する情報が得られる。診断的には、細胞膜の構造上の相対的な完全性に関する情報が得られる。

【0087】

実施例3

エレクトロポレーションを行った領域の電気インピーダンスマッピング

組織中のEITにおけるエレクトロポレーションのモニタリングにおけるEITの可能性を示すため、本発明者らはこの問題の数学的シミュレーションを解決した。

【0088】

エレクトロポレーションの画像化シミュレーションに必要なデータを得るため、まず二次元の微細格子FEMモデル（格子点 約1600、要素 約3100）を用いて模擬組織像を作成した。図9に示すこの像は、収量を変更できる点状の電極を円周に沿って等間隔に配置した、筋肉様の円形画像領域（半径20 mm、抵抗率500 $\Omega \cdot \text{cm}$ ）を含んだ。この画像領域内では、任意の形状の1つのエレクトロポレーション領域を異なる抵抗率で定義した。対向する電極電流注入パターンを用いて、 $N(N-1)/2$ （式中、 N は電極の数である）の独立した電圧を測定した。MATLAB's Partial Differential Equation Toolbox (The Mathworks Inc.)の適合格子生成法およびFEM解法アルゴリズムを用いてこのモデルを解釈した。与えられた幾何学的構造に対する格子の1例を図9に示す。像のモジュールにより再構成アルゴリズムへの利用が可能になる情報は、実験中のエレクトロポレーション中に得られたと考えられるデータ、すなわち組織周囲に配置した各電極の電流および電圧を示すものである。このデータから、本発明者らはこのモデルに入力した組織の原画像の再構成を試みた。（EITでは通常AC電流が使われるがこの実験では問題を単純化するためDC注入電流を用いたことは注意を要する。ACの導出および実施はここに示す結果をそのまま拡張したものである。）8電極EITシステムのシミュレーションデータ取得段階の、この像内の電圧および電流の典型的な例を図10に示す。

【0089】

この像から得られたデータを2つのEIT画像アルゴリズムに入力した。1つは有

限要素法、もう1つは境界要素法を用いてインピーダンス画像を生成した。いずれのアルゴリズムも画像の生成には標準的なニュートン・ラフソン(Newton Raph son)法を用いている。図11では、2つの異なる電気インピーダンスを有する円形の画像領域を、有限要素法および境界要素法で再生成した原画像と比較している。

【0090】

EITは組織の電気インピーダンスのマップから組織の画像を生成するものであり、エレクトロポレーションはインピーダンスの変化を生じさせるものであることから、電気インピーダンスによる断層撮影法を用いて組織中のエレクトロポレーションが起きた領域を画像化することができる。組織のエレクトロポレーションの画像化に用いる電極はエレクトロポレーション工程自体に用いる電極と異なることもあれば同一であることもある。

【0091】

実施例4

膜の透過性における変化の電氣的検出

細胞のエレクトロポレーションに関する研究の一部として、本発明者らは可逆的および不可逆的なエレクトロポレーション中の細胞の電氣的特性を調べた。可逆的なエレクトロポレーションでは、細胞はエレクトロポレーション工程によって損傷されず、細胞膜は再び塞がれる。不可逆的なエレクトロポレーションでは、細胞膜が損傷され再度塞がれることはない。ND-1細胞を用いて、マイクロエレクトロポレーション中に細胞を通過する電流を測定した一連の実験では、図8aおよび図8bに示す結果を得た。この結果は、図8aおよび図8bに示した三角形の電気パルス(一番上の曲線)に細胞を曝露することによって得られたものである。細胞を流れる電流は図8aおよび図8bの一番下の曲線に示す。図8aは不可逆的にエレクトロポレーションされた細胞、図8bは可逆的にエレクトロポレーションされた細胞に関する。可逆的にエレクトロポレーションされた細胞では、電圧を減少させたときに電圧を上昇させたときと同じ値が保たれていることが容易にわかる。しかし、不可逆的なエレクトロポレーションが起きた場合、膜が損傷された細胞を通る電流は無傷の細胞よりも大きくなった。したがって、特にエレクトロポレ

ーションの際だけでなく、細胞を流れる電流によって、一般的には膜の透過性における変化の指標を得ることができ、細胞膜の完全性を測定することができる。例えば、細胞の生存度は、損傷された膜を通過するトリパンブルーまたは蛍光色素を用いて測定されることが多い。これらの結果から、膜が損傷された細胞を検出する別の方法として、細胞における電流と電圧の関係を測定することもありえる。同様に、細胞膜の穿孔を誘発する、イオノフォアなど化合物が存在する。細胞膜における電流と電圧の関係（インピーダンス）を測定することにより、これらの化合物によって細胞膜が損傷されたかどうかを検出することも可能である。電気的測定ではただちに情報が得られることから、電気的測定は細胞膜の損傷を検出する上で化学的な方法よりも有利である。細胞膜の透過性における変化、特に損傷された細胞膜における変化を検出する方法として考えられるのが、エレクトロポレーション工程で記載したエレクトロポレーションチップの利用である。図8aおよび図8bに示したように、損傷の尺度は、無傷の細胞のインピーダンスと損傷された細胞のインピーダンスにおける差異であるといえる。組織中においても、本明細書に記載したエレクトロポレーションの検出法と同様の方法で膜が損傷された細胞を検出できると考えられる。

【 0 0 9 2 】

以上、特定の態様を参照しながら本発明を説明してきたが、それは本発明の真の精神と範囲から逸脱することなく、様々な変更や同等物による置換を行うことは、当業者に理解されるべきである。さらに、特定の状況、物質、物質の組成、工程、または工程段階を本発明の目的、趣旨、および範囲に適合させるために数多くの修正を行うことが可能である。こうした修正はすべて添付の特許請求の範囲内に入るものと解釈される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 エレクトロポレーションを行うための電流の補助を用いずに生物細胞に化学種を注入するための、本発明の実施に有用な微小拡散装置の断面図である。

【図2】 生物細胞に孔を形成し、また選択的にエレクトロポレーションの補助を用いて細胞に化学種を注入するための、本発明の実施に有用なマイクロエ

(43)

特表2003-505073

レクトロポレーション装置の断面図である。

【図3】 図3 aは可動性の生物細胞懸濁液用に設計された、本発明に基づくレクトロポレーション装置の縦断面図である。図3 bは図3 aに示す装置の横断面図である。

【図4】 図2に示すものと類似の構造のマイクロレクトロポレーション装置を用いて行った一連のレクトロポレーション実験の電圧電流プロット図である。

【図5 a, 5 b, 5 c, 5 d】 図2に示すものと類似の構造のマイクロレクトロポレーション装置を用いてさらに行った一連のレクトロポレーション実験の電圧電流プロット図である。

【図6】 図6 aはレクトロポレーション前の細胞周囲を流れる電流、図6 bはレクトロポレーション後（穿孔中）の細胞を通して流れる電流を示す。

【図7】 本発明で用いられる典型的な電気インピーダンストモグラフィ（EIT）システムを示す。

【図8】 図8 aは不可逆的なレクトロポレーションを生じた細胞を通る電流の流れ方の像、図8 bは可逆的なレクトロポレーションを生じた細胞を通る電流の流れ方の像である。

【図9】 電極（黒点）で囲まれた組織の円領域を示す有限要素格子のグラフ略図である。この領域は2つの異なるインピーダンスをもつ。

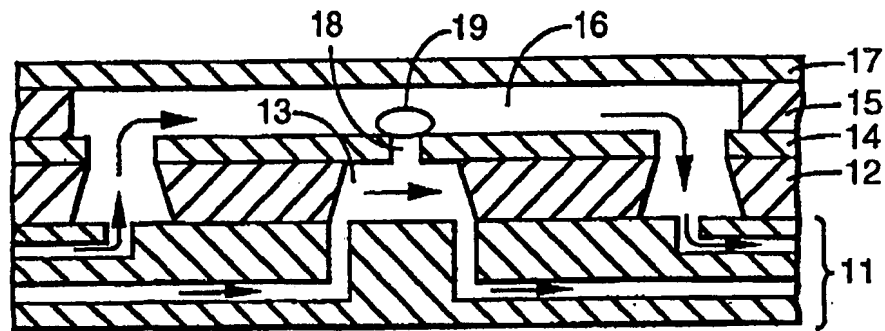
【図10】 典型的な電極構成、電氣的計量値、および、電気インピーダンスの異なる含有物を有する円形領域内の等ポテンシャル曲線を示す略図である。

【図11】 左上は実際の像、右下は差分インピーダンスマッピングを示すインピーダンスマッピングである。

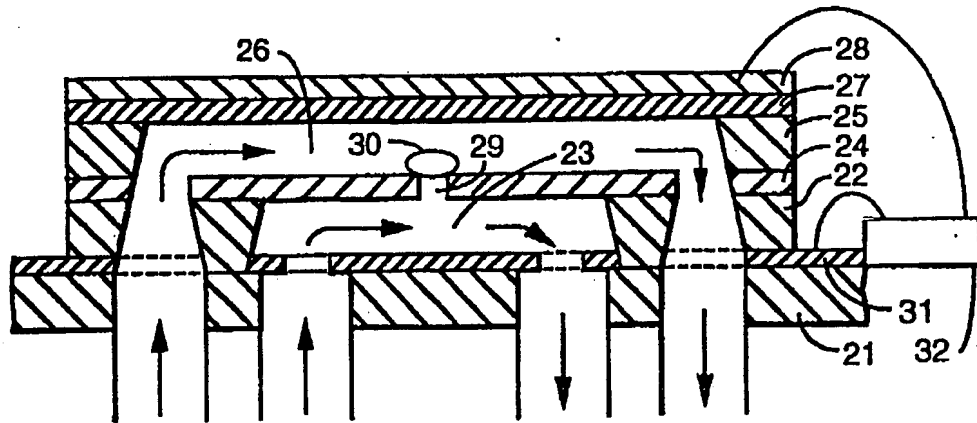
(44)

特表2003-505073

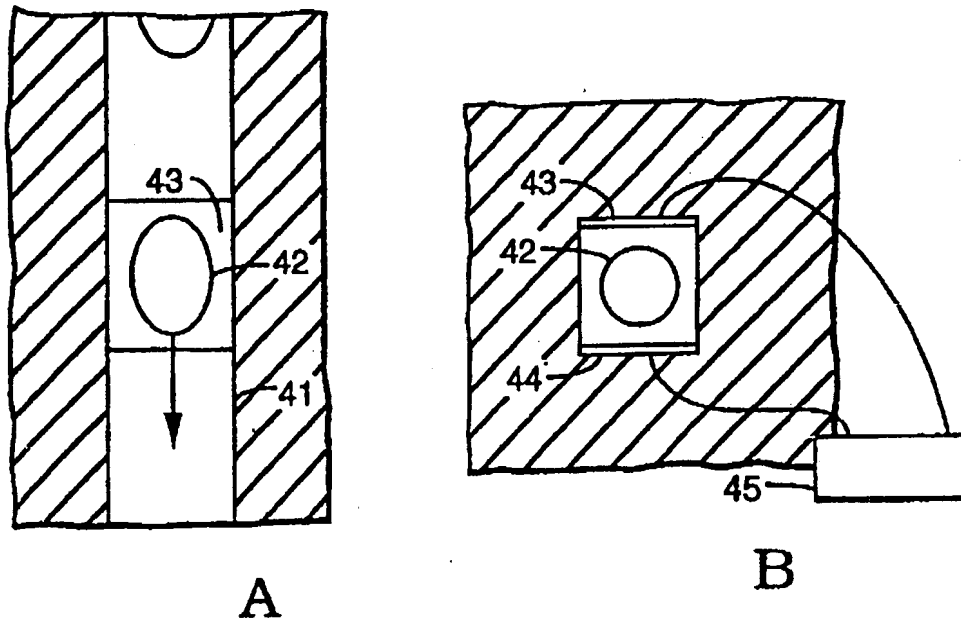
【図 1】



【図 2】



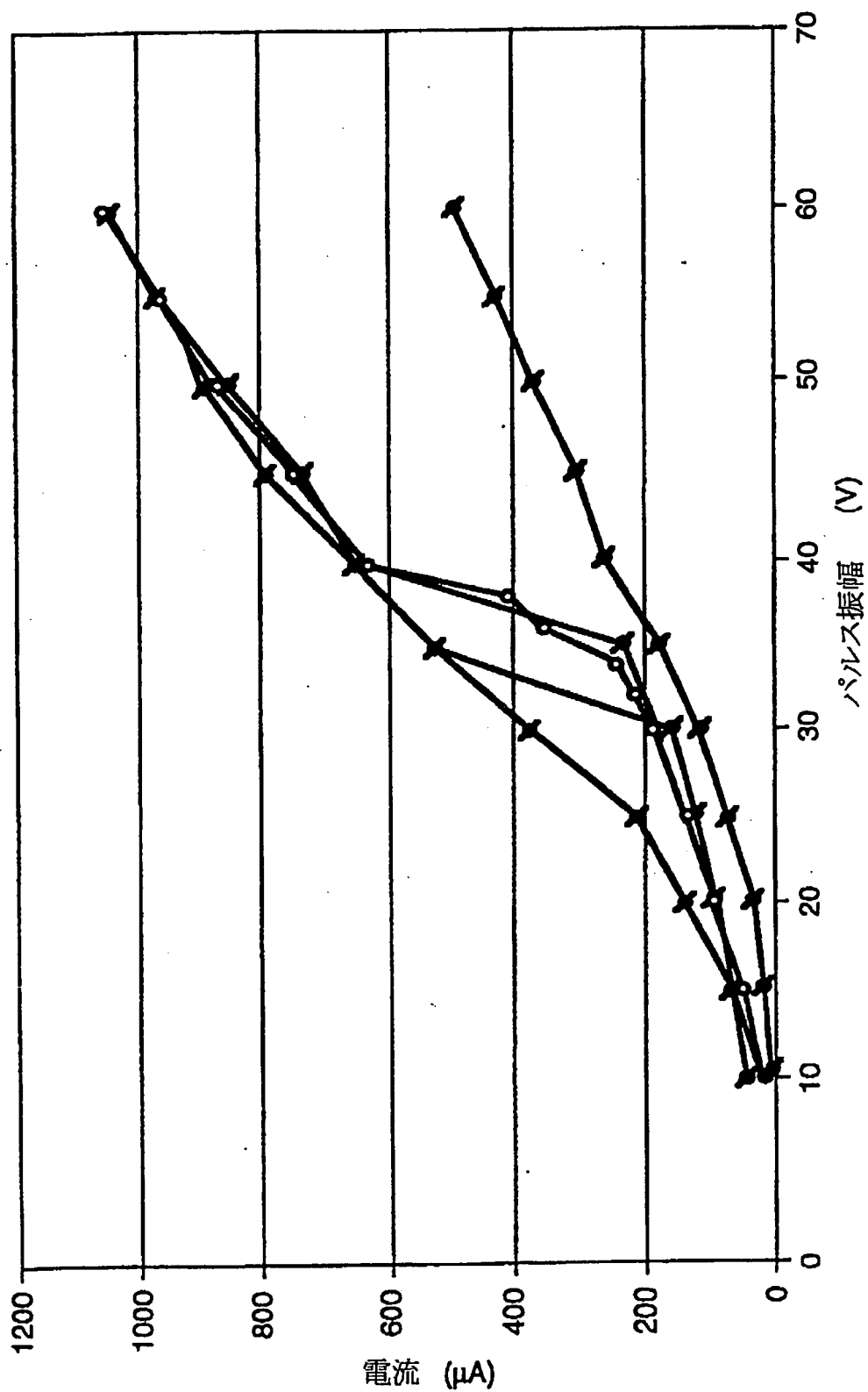
【図 3】



(45)

特表2003-505073

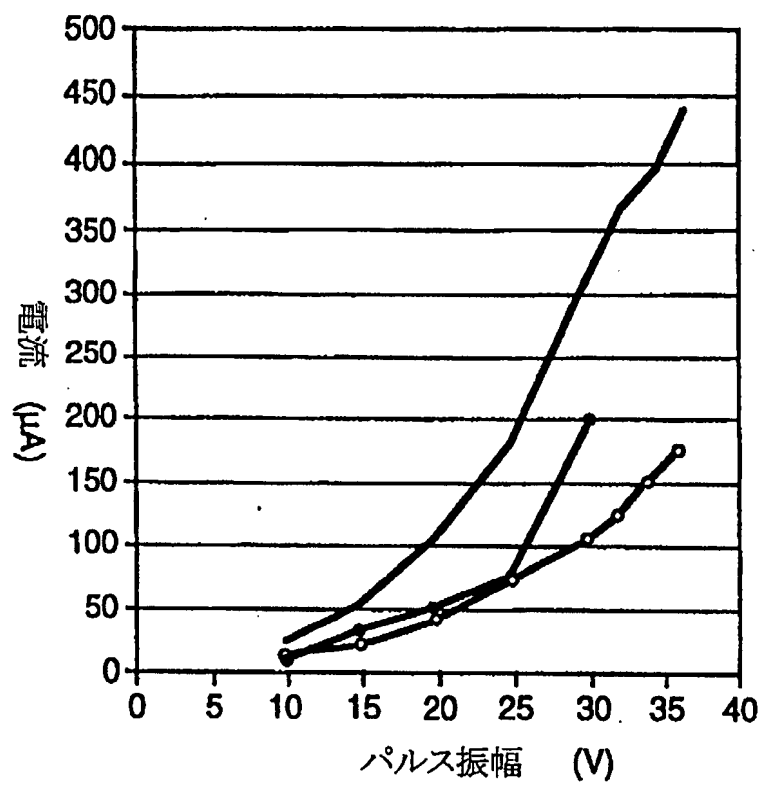
【図4】



(46)

特表2003-505073

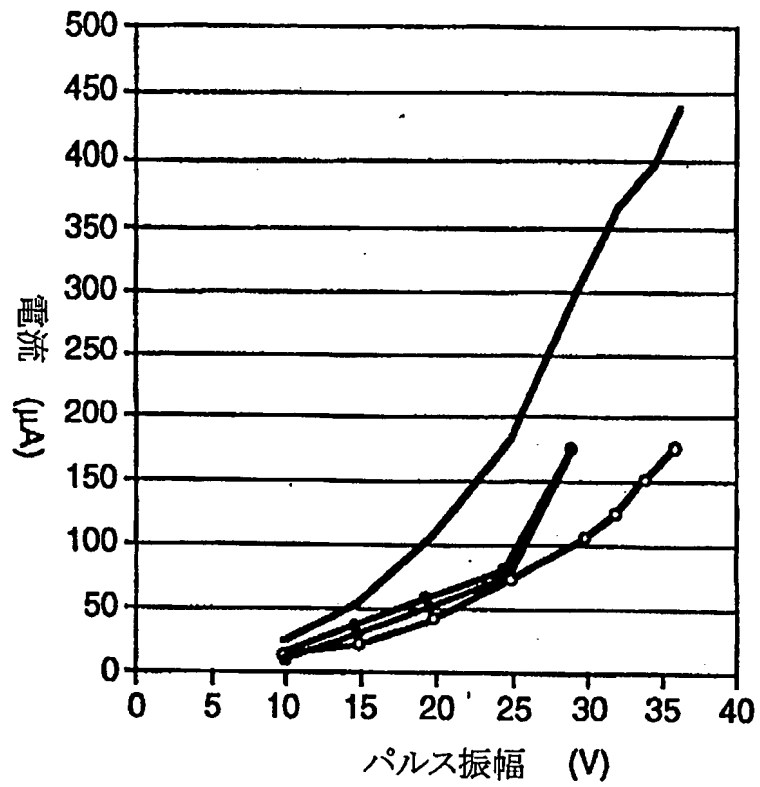
【図 5 a】



(47)

特表2003-505073

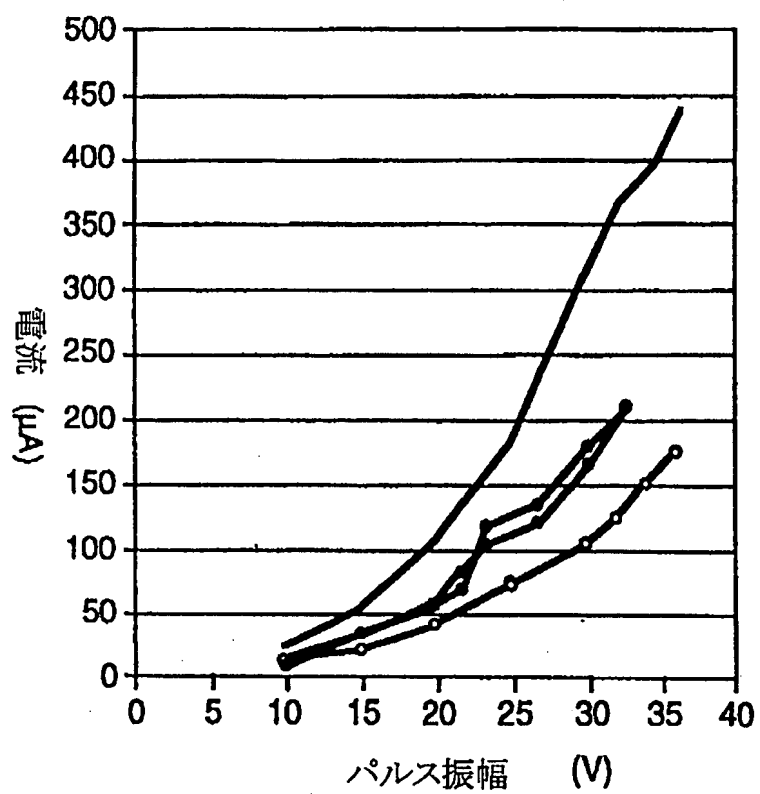
【図 5 b】



(48)

特表2003-505073

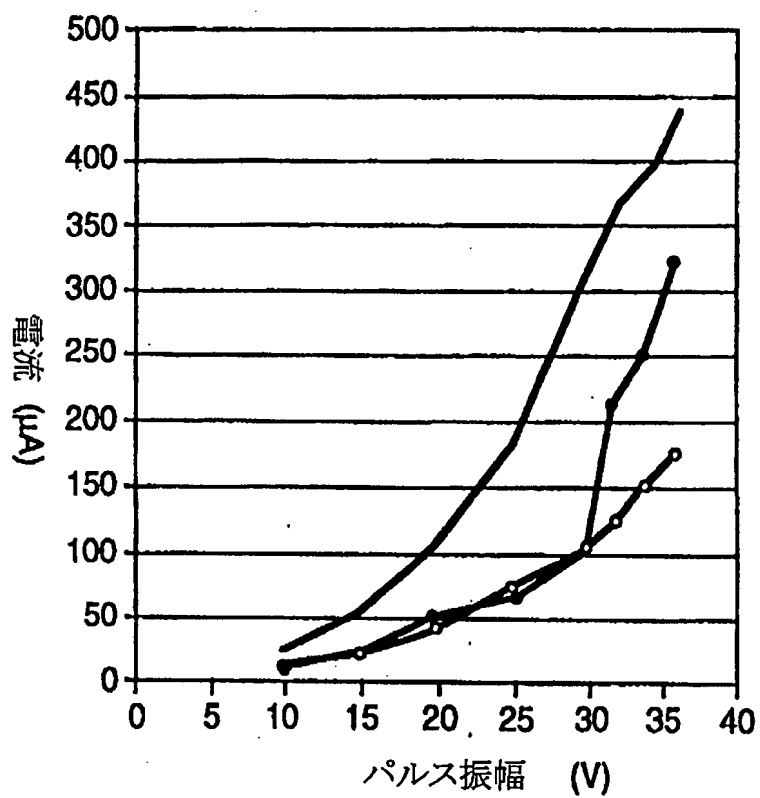
【図 5 c】



(49)

特表2003-505073

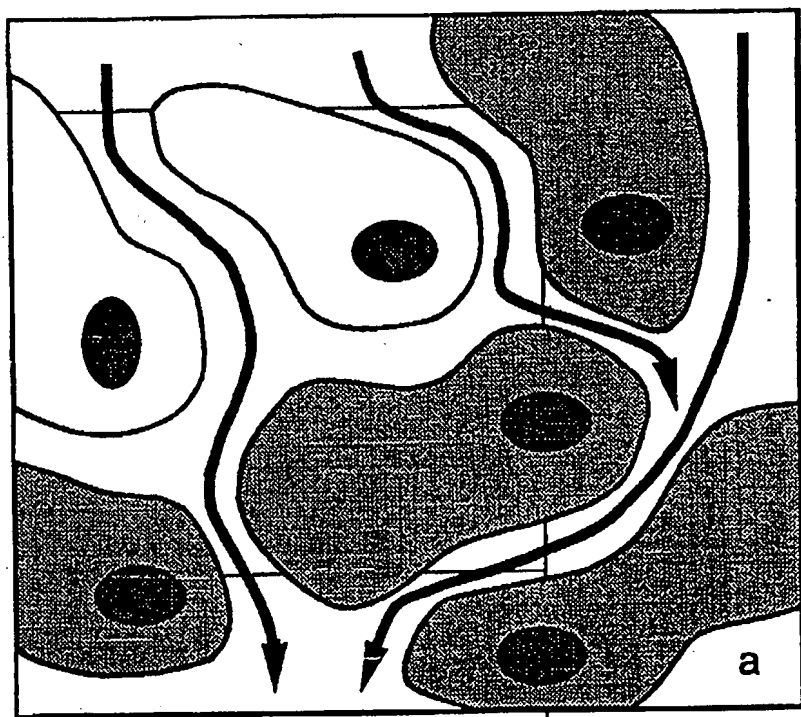
【図5d】



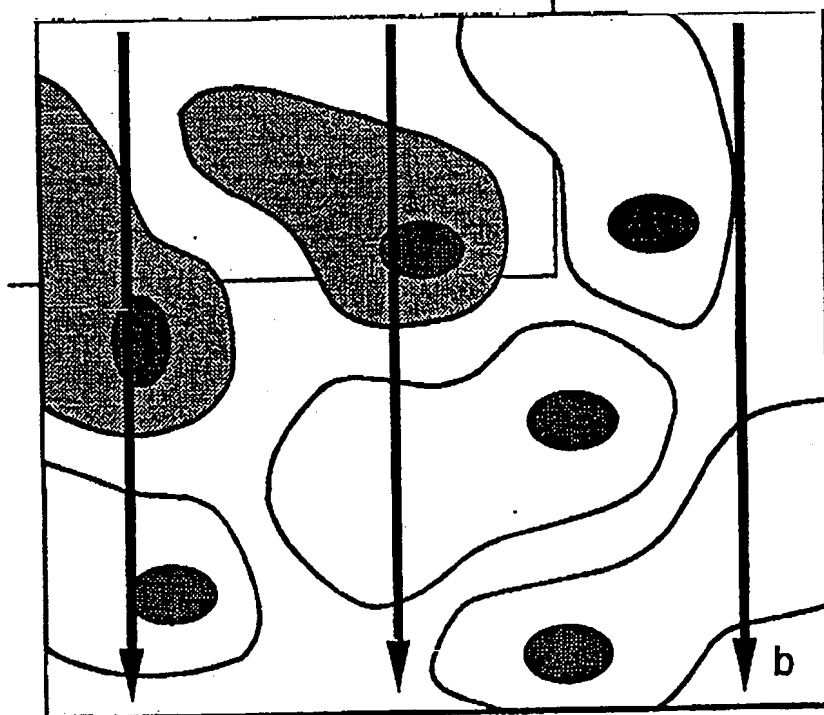
(50)

特表2003-505073

【図6】



a

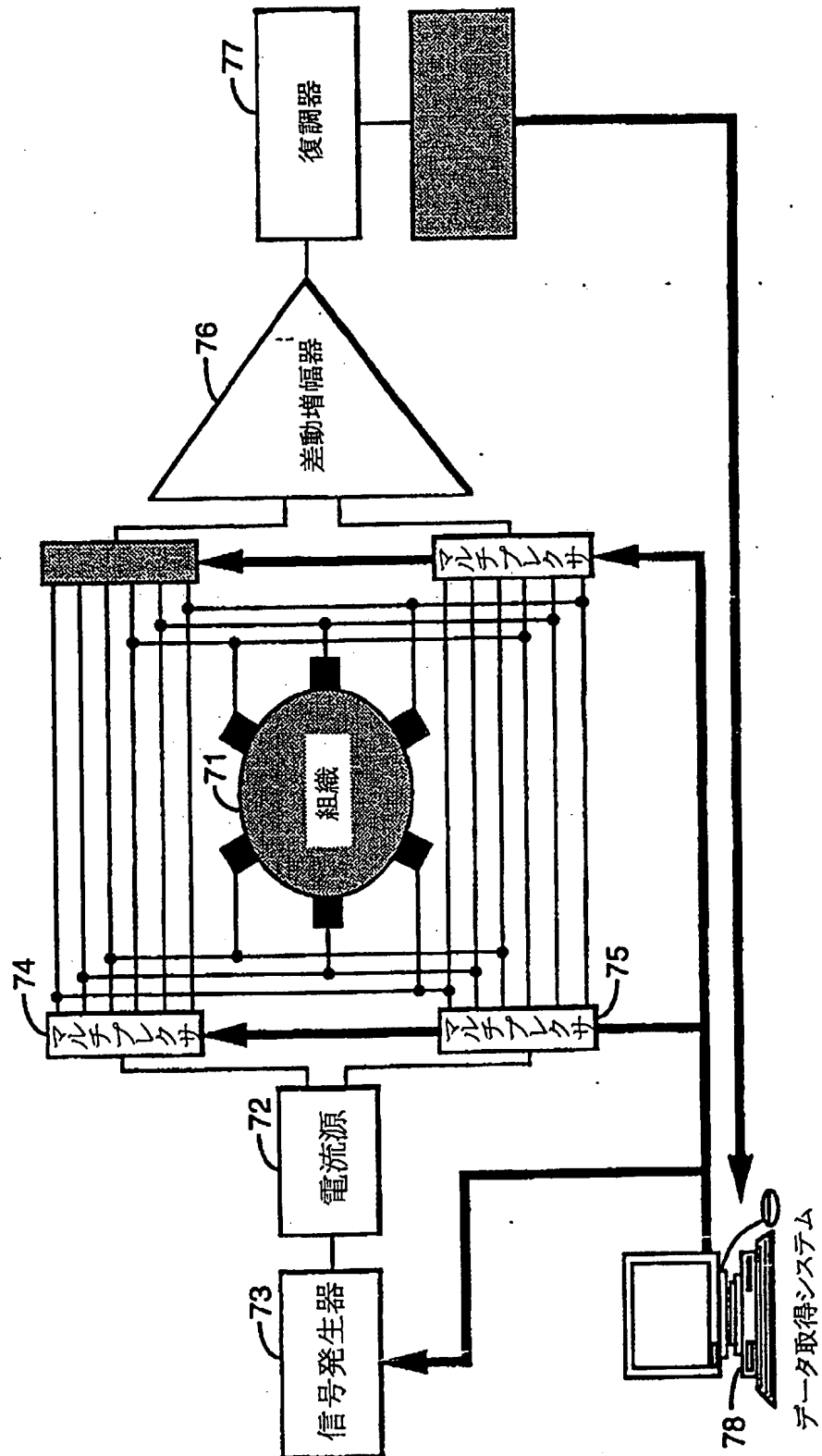


b

(51)

特表2003-505073

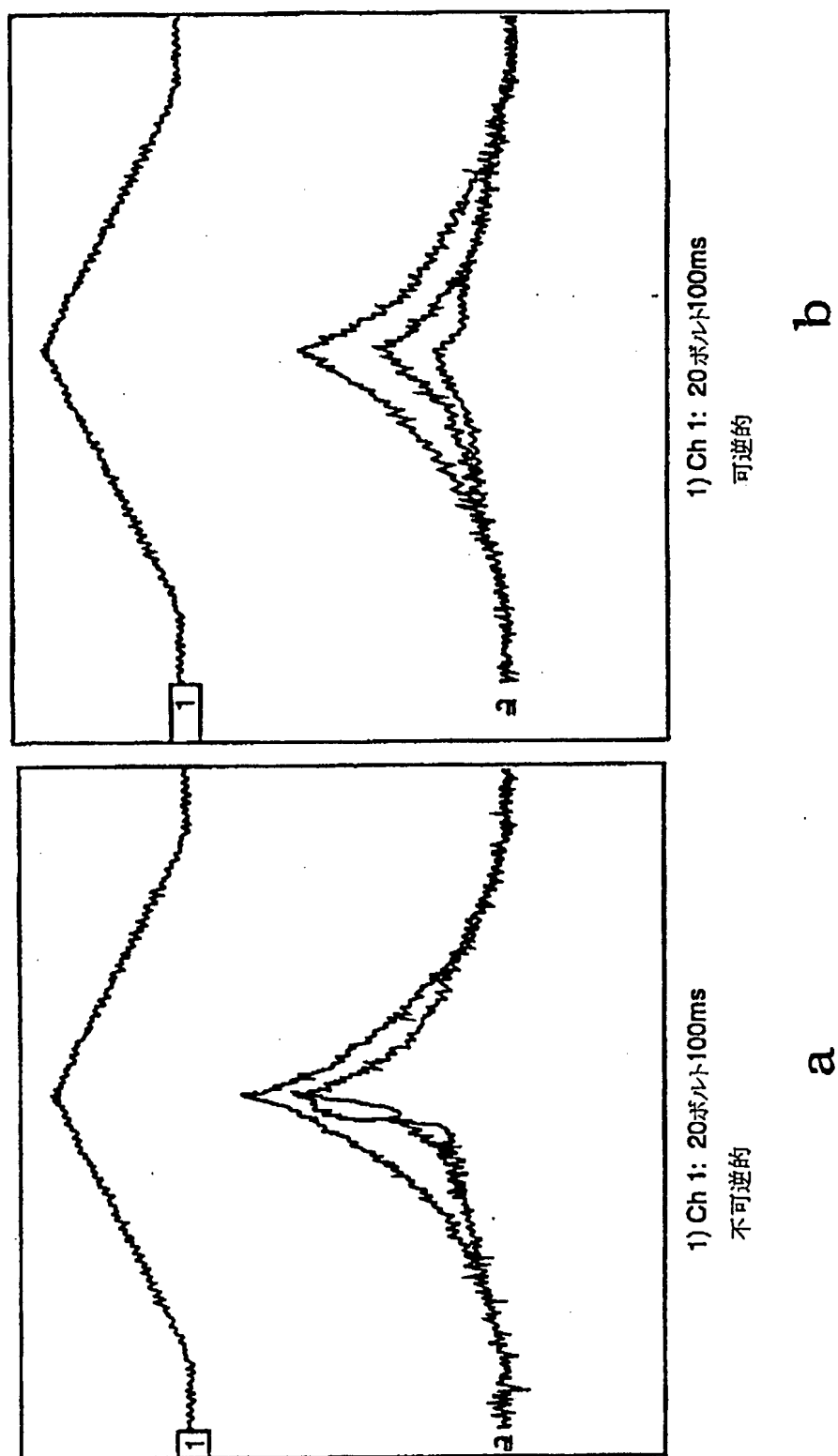
【図7】



(52)

特表2003-505073

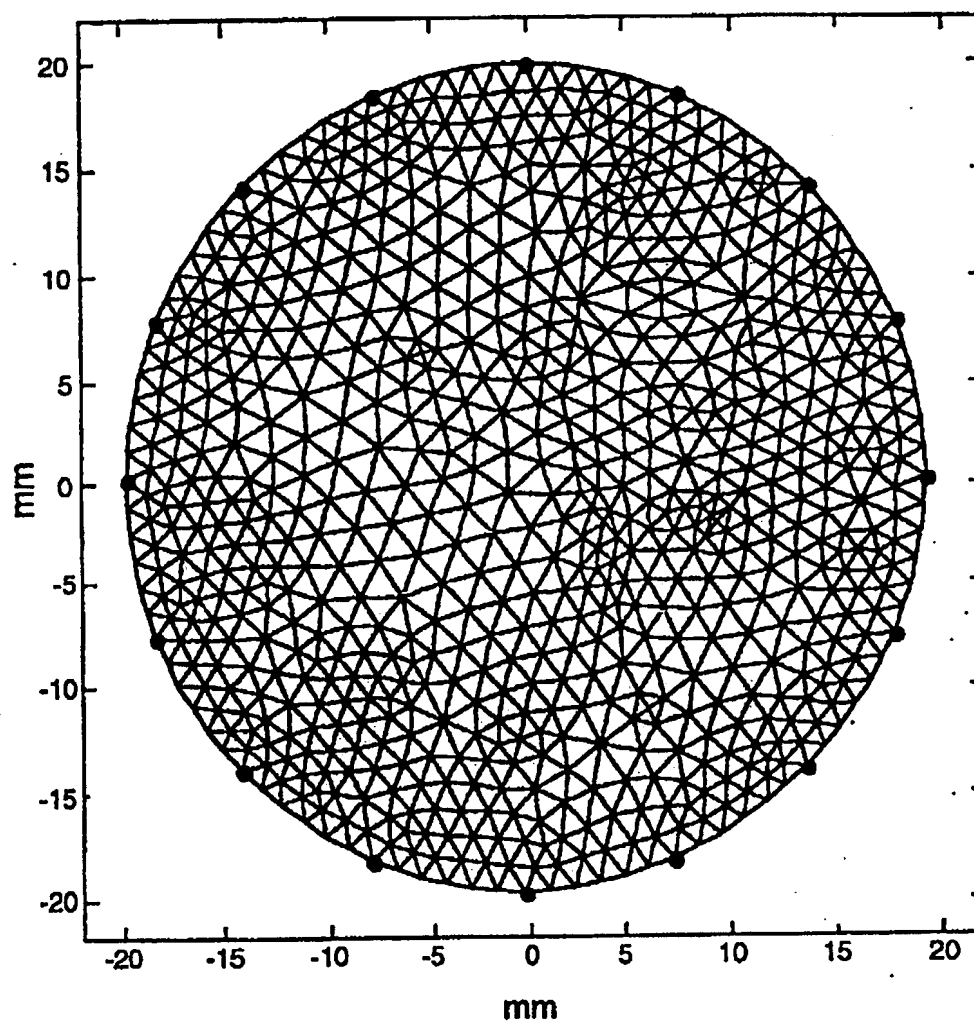
【図8】



(53)

特表2003-505073

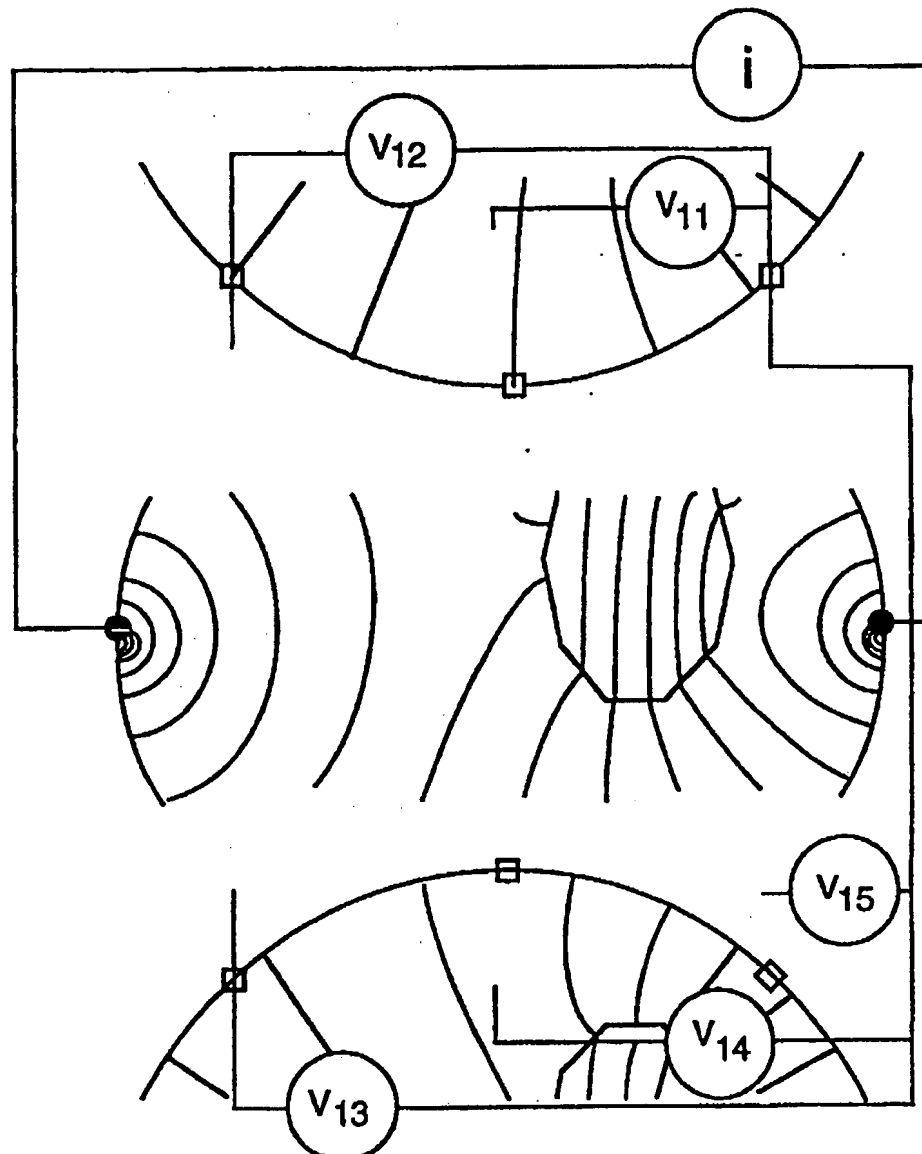
【図 9】



(54)

特表2003-505073

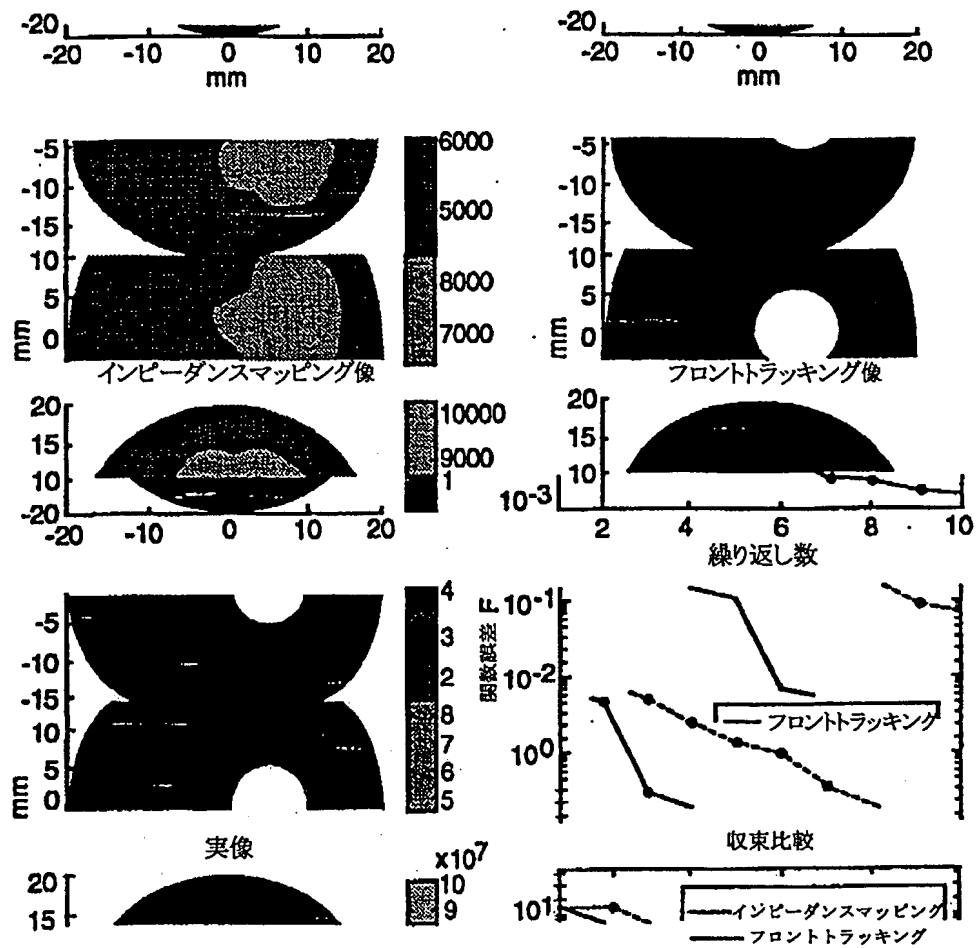
【図10】



(55)

特表2003-505073

【図11】



(56)

特表2003-505073

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/19975		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 13/00 US CL : 435/173.6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/173.6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPT, EPAB, JPAB, DWTI search terms: electroporation, control, regulate, modulate, analyze, measure				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	US 5,134,070 A (CASNIG D.R.) 28 July 1992, see especially column 13, lines 26-41 and claims.	1-47		
Y	US 5,098,843 A (CALVIN N.M.) 24 March 1992, see entire document.	1-47		
Y	SHARMA et al. Poloxamer 188 Decreases Susceptibility of Artificial Lipid Membranes to Electroporation. Biophysical Journal. December 1996, Volume 71, No. 6, pages 3229-3241, Abstract only available, see entire abstract.	1-47		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each contribution being obvious to a person skilled in the art "I" documents member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each contribution being obvious to a person skilled in the art "I" documents member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each contribution being obvious to a person skilled in the art "I" documents member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 11 SEPTEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 18 OCT 2000		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 303-3230		Authorized officer JON F. WEBER, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

(57)

特表2003-505073

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 DA02 GA14
4B029 AA24 BB11 CC01 CC03
4B033 NG05 NH02 NH07 NJ01 NK01
NK05
4B065 AA90X BA03 BD50 CA60
4C053 HH01 HH02